

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Valor de los compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado
en el diagnóstico del cáncer de pulmón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María de los Ángeles Muñoz de Lucas

Directores

**Luis Callol Sánchez
Javier Jareño Esteban
Concepción Civera Tejuca**

Madrid, 2017

**VALOR DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES
EN AIRE EXHALADO
EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PULMÓN**



M^º DE LOS ÁNGELES MUÑOZ LUCAS

DIRECTORES:

**LUIS CALLOL SÁNCHEZ, JAVIER JAREÑO ESTEBAN
CONCEPCIÓN CIVERA TEJUCA**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR 1



MADRID, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I



VALOR DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN AIRE EXHALADO EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PULMÓN

Memoria que para optar al Grado de Doctor presenta

María Ángeles Muñoz Lucas

Madrid 2015

D. Luis Callol Sánchez, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Medicina y Especialidades Médicas de la Universidad de Alcalá,

D. José Javier Jareño Esteban, Profesor Asociado de Medicina del Departamento de Medicina y Especialidades Médicas de la Universidad de Alcalá,

Y

D^a María Concepcion Civera Tejuca, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Química Física II (Fisicoquímica Farmacéutica) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado “VALOR DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES EN AIRE EXHALADO EN EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PULMÓN” realizado bajo nuestra dirección por **D^a M^a Ángeles Muñoz Lucas**, reúne los requisitos necesarios de interés científico y rigor metodológico para ser presentado y defendido para optar al grado de Doctora.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid, a 5 de Agosto de 2015.



Fdo. Prof. Luis Callol Sánchez



Fdo. Prof. Javier Jareño Esteban



Fdo. Prof. Concepción Civera Tejuca

Esta Tesis se realizó con un Proyecto FIS: PI07/1116, y ayudas a la investigación por las Sociedades Científicas: Neumomadrid y Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR).

*A mi familia,
Padres, hermanas y mis "niñ@s"*

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Es difícil expresar en pocas líneas el agradecimiento que siento hacia todas las personas que de una manera u otra han colaborado para la realización de esta tesis doctoral. He de destacar que este trabajo es el fruto del esfuerzo, perseverancia y apoyo de muchas personas que lo han hecho posible.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento al Profesor Luis Callol por su apoyo, por sus enseñanzas, su compromiso, por transmitir sus ganas de mejorar en la investigación, por su confianza en mí, y por inculcarnos su *“Fe ciega en la victoria”*.

Al Dr. Javier Jareño, eres un ejemplo de trabajo y compromiso. Javier, gracias por tu amistad, dedicación y constante ayuda.

A la Profesora Concepción Civera Tejuca, por su paciencia, su buen hacer, sus enseñanzas y todo el apoyo que siempre me has prestado.

A “Maldi”, por todo su apoyo mostrado desde un inicio y sus sabios consejos.

A Manuel Caamaño por su amistad, colaboración y ayuda.

Al grupo de investigación en diagnóstico precoz de cáncer de pulmón. Gracias por vuestra colaboración. Este trabajo es fruto del buen hacer de todos vosotros.

Agradecer especialmente a Regina y a Javier, vuestra ayuda y apoyo, sobre todo en los momentos más críticos del estudio. Mil gracias.

A “*Uni-Químicas*” y a “*hola*”, por todos esos buenos ratos que pasamos y que siempre nos sacan una sonrisa. Por ese apoyo continuo y esa forma de tan particular de animarme para la finalización de la tesis.

A todas mis amigas y amigos. Gracias por estar ahí.

Y el más sincero de los agradecimientos para todos los participantes que han formado parte de este estudio, por su colaboración desinteresada. Un millón de gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas	15
Summary	19
Resumen	27
1. Introducción	35
1.1. Etiología del cáncer de pulmón	37
1.2. Diagnóstico	38
1.3. Alteraciones genéticas en el cáncer de pulmón	40
1.4. Clasificación histológica del cáncer de pulmón y clasificación TNM	41
1.5. Diagnóstico precoz del cáncer de pulmón	44
1.6. Metabólomica, metabonomica: biomarcadores	52
1.7. Estrés oxidativo. Radicales libres. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	57
1.8. Estrés oxidativo y cáncer	59
1.9. Mecanismos de neutralización de ROS por el citocromo P450	64
1.10. Radicales libre y daño tisular	65
1.11. Análisis del aire exhalado. Determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOC)	71
1.11.1. Estudios de VOC en EPOC	85
2. Hipótesis	93
3. Objetivos	97
4. Materiales y métodos	101
4.1. Materiales	101
4.2. Métodos	103
4.2.1. Diseño del estudio y definición de los grupos	103
4.2.2. Toma de la muestra	105
4.2.3. Selección de compuestos a estudiar	106
4.2.4. Técnica analítica	108
4.2.5. Análisis estadístico	118
5. Resultados	123
5.1. Validación del método analítico	123
5.1.7. Estabilidad de muestra	130
5.2. Análisis demográfico	132
5.3. Categorización según la determinación de los VOC	136
5.3.1. Estudio del grupo control	137

5.3.2. Estudio del grupo EPOC	142
5.3.3. Estudio del grupo cáncer de pulmón	146
5.3.4. Sensibilidad y especificidad del ácido nonanoico y ácido propanoico en cáncer de pulmón	158
6. Discusión	165
6.1. Metodología analítica	165
6.1.1. Recogida de la muestra	165
6.1.2. Almacenaje de la muestra	167
6.1.3. Técnicas analíticas	169
6.2. Desarrollo del método analítico	170
6.2.1. Obtención de la muestra. El problema del agua en el aire alveolar	170
6.2.2. Selección de compuestos	171
6.3. Estudio de los VOC en el grupo control	174
6.4. Comparación del grupo EPOC frente al grupo control	176
6.5. Comparación del grupo de cáncer de pulmón frente al resto de los grupos	178
6.6. Comparación de subgrupos de cáncer de pulmón con EPOC y sin EPOC	180
7. Conclusiones	185
8. Anexos	190
9. Bibliografía	195

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMDIS	Automated Mass spectral Deconvolution and Identification System
CP	Cáncer de pulmón
CYP	Citocromo P450 (siglas en inglés)
DRS	Deconvolution Report Software
DPCP	Diagnóstico Precoz de Cáncer de Pulmón
EBUS	Ecobroncoscopia
EF	Ex fumador
ELCAP	Early Lung Cancer Action Project.
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
F	Fumador
GC	Cromatografía de gases (siglas en inglés)
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia (siglas en inglés)
ICP	Carcinoma de pulmón microcítico
IPA	Índice tabáquico acumulado
LOD	Límite de detección
LOH	Pérdida de heterocigosidad (siglas en inglés)
LOQ	Límite de cuantificación
MS	Espectrometría de masas
NICP	Carcinoma de pulmón no microcítico
NF	No fumador
NPS	Nódulo pulmonar solitario
OMS	Organización mundial de la salud
PAFF	Punción-aspiración con aguja fina

ppm	Partes por millón ($\mu\text{g/mL}$)
PET	Tomografía por emisión de positrones
Rédox	Reducción-oxidación
RL	Radicales libres
RMN	Resonancia magnética nuclear
RX	Radiografía de tórax
SPME	Microextracción en fase sólida (siglas en inglés - Solid-phase microextraction)
TC	Tomografía computerizada
TIC	Cromatograma (Total ion chromatogram)
TCBR	TC de baja radiación
TD	Desorción térmica
TIC	Total Ion Chromatogram - Cromatograma
TNM	Sistema de estadificación de cáncer de pulmón basado en características del tumor (T), adenopatías tumorales (N), y metástasis (M)
RLO	Radicales libres de oxígeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno (siglas en inglés)
RNS	Especies reactivas de nitrógeno

SUMMARY

SUMMARY

BACKGROUND

Lung cancer (LC) is the leading cause of cancer death in men and the third in women. Less than 20% of cases are diagnosed in early stages, with a 5-year survival rate of 15%. However, with a diagnosis at an early stage, survival might be as high 80%.

As shown by these numbers, it is of an utmost importance to develop screening methods for high-risk population. In 2012 it was shown that an early diagnosis of LC through low-radiation CT compared to conventional radiology decreased mortality by 20%. In order to increase profit and diminish risk and reduce costs, patients should meet strict inclusion criteria. Biomarkers might be a helpful tool.

The analysis of the exhaled breath is of special interest. It is a noninvasive technique that analyzes patients' breath samples and aims to discriminate between subjects with and without LC.

It has been observed that exhaled breath compounds differ in patients with and without LC. Although these results are very encouraging, the lack of standardization regarding sample collection, the use of supplies, technical and analytical method, and compounds with greater discriminatory power, make it difficult to compare results.

HYPOTHESIS

"As a result of neoplastic disease, there might be specific VOC to patients with LC".

AIMS

1) To determine whether there are significant differences between volatile organic compounds (VOCs) of exhaled breath samples of patients with LC, and samples obtained

from patients with COPD and control groups.

2) To determine the effect of smoking on VOCs of exhaled breath of presumably healthy subjects.

3) To determine whether there are differences in exhaled VOC in patients diagnosed with COPD and presumably healthy volunteers.

MATERIAL AND METHODS

Case-control study with non probabilistic consecutive sampling. We included 210 subjects from the Hospital Central de la Defensa "Gómez Ulla", Cuartel General del Aire and Hospital Clínico San Carlos between October 2010 and December 2011. Subjects were divided into 3 groups: control group (n = 89 healthy subjects); COPD group: 40 patients with stable COPD; LC group : 81 patients with histological diagnosis of LC.

Inclusion criteria: Informed consent, 40years older, no limitation as to gender or smoking habit.

Exclusion criteria (no tumor groups): Current or previous malignant disease of any kind, and pulmonary disease other than COPD. Refusal to participate in the study.

We obtained samples of exhaled breath from each subject and the room's ambient air the patient had stayed in by means of BioVOC® sample tubes. The collected air was then transferred to a thermal desorption tube.

The analyzed compounds were hexanal, heptanal, octanal, nonanal, nonanoic acid and propionic acid.

Samples were analyzed by thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry.

Statistical analysis:

- Index of central tendency for VOC: median and interquartile range.
- Kruskal Wallis and Mann Whitney test. Qualitative study: Odds Ratio test based on logistic regression.
- Linear correlation of quantitative variables: Spearman test.
- Diagnostic test: positive predictive value, negative predictive value, sensitivity and specificity.
- Statistically significant association: $p < 0.05$.
- Statistical program SPSS v.15.

RESULTS***Control group***

We observed statistically significant differences between values of nonanal in healthy subjects with a smoking history (either current or former smoker) as compared to healthy nonsmokers ($p = 0.019$). This finding is related to the patients' smoking history, either current or an ex-smoker. It is independent of gender (male: $r = 0.05$, $p = 0.753$ and female: $r = 0.081$, $p = 0.588$) and the amount of consumed tobacco ($p = 0.823$).

COPD and Control groups

We observed no statistically significant differences between VOCs of the COPD and control groups in both quantitative and qualitative analyses.

Lung cancer, COPD and Control groups

Nonanoic acid values were the only showing statistical significance as we compared the LC to the Control ($p = 0.011$) and COPD groups ($p = 0.001$). The probability of finding

this VOC was three 3 times higher in patients with LC ($p = 0.001$) as compared to subjects without LC (COPD and Control groups). The observed sensitivity was 32%, the specificity was 87.6%, the positive predictive value (PPV) 62% and the negative predictive value (NPV) was 67%.

Lung Cancer group: With and without COPD

We observed statistically significant differences of **propionic acid** values between groups with an OR of 4.71 and $p = 0.003$. Interestingly, in 85% of non-COPD - LC patients we failed to determine any levels of propionic acid in exhaled breath samples. Most subjects of this subgroup were non-smokers with a diagnosis of adenocarcinoma. The sensitivity was 66.7% and specificity 70.18%, with a PPV of 48.5% and NPV of 83%.

CONCLUSIONS

1. Nonanoic acid might discriminate LC from and other groups, and in this way might be considered a tumor marker (specificity: 87%).
2. The absence of propionic acid might be associated with LC patients without COPD. In the subgroup of non-smokers with adenocarcinoma, the absence becomes 100%.
3. Nonanal values were higher in healthy subject with smoking history (either current or former smokers) as compared to the values in healthy non-smokers. It relates to the fact of being or having been a smoker. It is independent of gender and the amount of consumed tobacco.
4. We found no single VOC that discriminated COPD from control groups.
5. We developed an analytical method for determining and identifying VOCs in exhaled breath. However it is not enough for proper reproducibility in carboxylic acids.

6. A standardization of materials, collection and analysis methods employed are needed to allow the use of VOC as tumor markers in clinical practice.

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el cáncer de pulmón (CP) representa la primera causa de muerte por cáncer en el hombre y la tercera en la mujer. Menos de un 20% de los casos que se diagnostican se encuentran en estadios tempranos, con una supervivencia a 5 años del 15%. Sin embargo, cuando el tumor se diagnostica en fases tempranas, la supervivencia puede llegar a ser del 80%.

Con estos datos es necesario disponer de programas de cribado para una población de alto riesgo. En 2012 se demostró que el diagnóstico precoz con tomografía computerizada de baja radiación disminuía la mortalidad en un 20% con un seguimiento a 6.5 años frente a la radiología convencional.

Para aumentar la rentabilidad y disminuir los riesgos y costes, hay que establecer criterios de inclusión más acotados. El empleo de biomarcadores podría contribuir a este fin.

El análisis del aire exhalado es de especial interés. Es una metodología no invasiva que trata de establecer diferencias entre muestras de aire de población con y sin cáncer, tras los efectos del estrés oxidativo.

Se ha visto que existen diferencias en los compuestos exhalados en pacientes con CP frente a personas sin CP. Aunque estos resultados son muy esperanzadores, la falta de estandarización en cuanto a la recogida de muestra, consumibles, técnica y método analítico, y compuestos con mayor poder discriminatorio, hacen difícil la comparación de los resultados obtenidos.

HIPÓTESIS

“Como consecuencia de la enfermedad neoplásica, podrían existir VOC específicos en pacientes con CP frente a una población sin CP”.

OBJETIVOS

- 1) Buscar diferencias significativas de los VOC en aire exhalado en una población con cáncer de pulmón frente a grupos EPOC y control.
- 2) Determinar el efecto del hábito tabáquico sobre los VOC detectados en aire exhalado en una población presuntamente sana.
- 3) Determinar si existen diferencias en los VOC exhalados en pacientes con diagnóstico de EPOC frente a una población presuntamente sana.

PACIENTES Y MÉTODOS

Estudio casos control, con muestreo consecutivo no probabilístico. Se reclutaron 210 personas entre el Hospital Central de la Defensa "Gómez Ulla", Cuartel General del Ejército del Aire y Hospital Clínico San Carlos, desde octubre de 2010 a diciembre de 2011. Se dividieron en 3 grupos: grupo control: (n=89 personas sanas); grupo EPOC: 40 pacientes con diagnóstico de EPOC en estabilidad clínica y seguimiento ambulatorio; y grupo CP: 81 pacientes con diagnóstico histológico de CP.

Criterios de inclusión: aceptación personal, mayor de 40 años, sin restricción por género ni tabaquismo.

Criterios de exclusión (grupos no tumorales): Existencia de enfermedad tumoral actual o previa de cualquier aparato o sistema, y enfermedad pulmonar con excepción de EPOC. La negativa a participar en el estudio.

A los participantes se les tomó una muestra de aire exhalado mediante BioVOC®. A continuación se recogió una muestra de aire ambiental de la sala. El aire recogido se traspasó a un tubo de desorción térmica.

Los compuestos estudiados fueron hexanal, heptanal, octanal, nonanal, ácido propanoico y ácido nonanoico.

Las muestras fueron analizadas por desorción térmica-cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Variables:

Estadística descriptiva: Índice de tendencia central para VOC: mediana y rango intercuartílico.

Estadística analítica: Test de Kruskal Wallis y de Mann Whitney. Estudio cualitativo: Odds Ratio basado en la regresión logística.

Correlación lineal de las variables cuantitativas: test de Spearman.

Prueba diagnóstica: valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, sensibilidad y especificidad.

Asociación estadísticamente significativa: valor de $p < 0,05$.

El programa estadístico SPSS® v.15.

RESULTADOS

Estudio del grupo control

El nonanal muestra significación estadística entre personas sanas con historia de tabaquismo (actual o previo) frente a personas sanas no fumadoras ($p=0.019$). Este hallazgo se relaciona con la cualidad de ser o haber sido fumador. Es independiente del género (hombres: $r=0,05$, $p=0,753$ y en mujeres: $r=0,081$, $p=0,588$) y de la cantidad de

tabaco consumido ($p=0.823$).

Estudio del grupo EPOC frente a grupo control

No se han observado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los VOC entre los grupos de EPOC y control tanto en el estudio cuantitativo como cualitativo.

Estudio del grupo cáncer de pulmón frente a grupo control y grupo EPOC

El ácido nonanoico es el único VOC que muestra significación estadística para el grupo CP frente a los grupos control ($p=0.011$) y EPOC ($p=0.001$). La probabilidad de hallar este compuesto en personas con CP 3 veces mayor ($p=0,001$) que en personas sin CP (EPOC y Control). La sensibilidad es del 32% y la especificidad del 87.6%, con valor predictivo positivo (VPP) del 62% y valor predictivo negativo (VPN) del 67%.

Grupo cáncer de pulmón: con EPOC vs sin EPOC

El ácido propanoico muestra diferencias significativas con una OR de 4.71 y $p=0.003$. No se ha detectado ácido propanoico en el 85% de los casos del subgrupo CP sin EPOC. La mayor parte de este subgrupo corresponde a pacientes no fumadores con adenocarcinoma. La sensibilidad es del 66.7% y la especificidad del 70,18%, con un VPP de 48,5% y un VPN de 83%.

CONCLUSIONES

1. El ácido nonanoico discrimina entre el grupo CP y el resto de grupos, pudiendo considerarlo marcador de cáncer, con una especificidad del 87%.
2. La ausencia de ácido propanoico se asocia al subgrupo de CP sin EPOC. En el subgrupo de pacientes no fumadores y con histología de adenocarcinoma llega a ser del 100%.

3. El nonanal muestra significación estadística entre personas sanas con historia de tabaquismo (actual o previo) frente a personas sanas no fumadoras. Se relaciona con la cualidad de ser o haber sido fumador. Es independiente del género y de la cantidad de tabaco consumido.
4. No se ha encontrado ningún VOC que diferencie entre los grupos EPOC y Control.
5. Se ha puesto a punto un método analítico que permite determinar e identificar VOC en aire exhalado, pudiendo reprocesar con facilidad en busca de posibles nuevos marcadores. No obstante es insuficiente para la correcta reproducibilidad en la determinación de ácidos carboxílicos.
6. Es necesario un acuerdo de consenso para normalizar la recogida y procesamiento de las muestras de aire exhalado que permita la posible aplicación de los VOC como marcadores en la práctica clínica.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón (CP) fue citado por primera vez como una curiosidad en 1422 por Parecelso (*Bergkrankheit*), pero no fue hasta 1879 cuando Hesse llevó a cabo la primera descripción de esta patología, filiándola de manera incorrecta como sarcoma pulmonar¹. Sin embargo, desde principios del siglo XX, la incidencia ha ido en aumento de manera alarmante con el consumo de tabaco. Tanto es así, que el cáncer primario de pulmón ha pasado de ser una patología prácticamente desconocida a principios del siglo XX a ser actualmente un problema de salud pública. Representa el 12% de todos los cánceres, su mortalidad es la más elevada de todos los cánceres y además se ha convertido en la segunda causa de muerte por cáncer en el hombre y la cuarta en la mujer (tabla 1), según los datos publicados en el informe de GLOBOCAN-2012², para las cifras del cáncer en España en 2014 (figura 1) la primera causa de muerte por cáncer en el hombre y la tercera en la mujer, después del cáncer de mama y de colon.

Tabla 1. Localizaciones más frecuentes del cáncer en España, según el nº de casos. Datos de 2012

	Hombre	Mujer
1ª	Próstata	Mama
2ª	Pulmón	Colorrectal
3ª	Colorrectal	Cuerpo de Útero
4ª	Vejiga	Pulmón
5ª	Estómago	Ovario

Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC.⁽²⁾

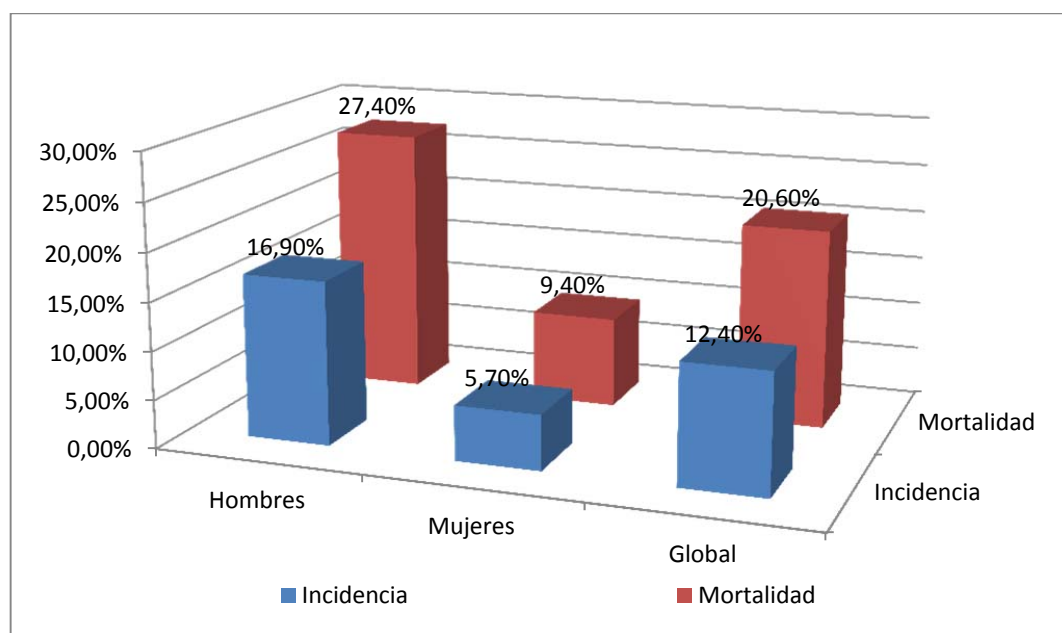


Figura 1. Incidencia y mortalidad del CP en hombre y mujeres de todas las edades en España en 2012. Proporciones por 100.000 habitantes. Fuente: Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC².

En España, según datos publicados por el Centro Nacional de Epidemiología, en el año 2012, fallecieron por esta causa 21.476 personas (17.654 hombres y 3.822 mujeres), observándose un incremento, en el número de defunciones por cáncer de pulmón en mujeres, respecto al año 2006, atribuible al incremento del consumo de tabaco en mujeres³.

La distribución por estirpes histológicas es muy variable y va a depender de muchos factores externos como el tabaco, exposición laboral, exposición a otro tipo de carcinógenos o bien de factores biológicos como el género. Las estirpes más ligadas al consumo de tabaco son los tipos epidermoide y microcítico, mientras el adenocarcinoma, que predomina más frecuentemente entre las mujeres, tiene una relación menor con el mismo⁴. Durante las últimas décadas se han producido cambios en la incidencia en el sexo

femenino y en la epidemiología, con una tendencia universal al incremento de la proporción de adenocarcinomas y a la disminución de epidermoides, porcentaje que varía según los países⁵. Últimos estudios apuntan a que el CP en las mujeres presenta unas características biológicas diferentes que en los hombres, siendo más vulnerables a los efectos del tabaco. Además, los estrógenos parecen afectar de forma directa o indirecta al crecimiento tumoral^{6,7,8}.

1.1. Etiología del cáncer de pulmón

La etiología del CP, como cualquier otra neoplasia, es multifactorial. Sin embargo, la componente genética es muy escasa frente al papel que desempeñan los compuestos carcinógenos presentes en el humo del tabaco.

Se ha demostrado que existe una relación entre la cantidad de tabaco consumido y el riesgo de desarrollar un tumor pulmonar. De tal modo que a mayor consumo, más duración, y edad más temprana de inicio del tabaquismo, existe mayor riesgo para CP. Tomando como referencia a población no fumadora, el riesgo de CP aumenta de 2 a 8 veces en fumadores de 15 cigarrillos al día y de 16 a 25 veces más cuando el consumo es superior a 30 cigarrillos al día.

También se ha establecido relación entre CP y tabaquismo pasivo. La combustión del tabaco genera humo con 2 corrientes diferentes: *corriente principal* (la que se forma por medio de la aspiración del fumador) y la *corriente secundaria* que se produce al consumirse el cigarrillo, y que puede ser inhalada por los fumadores pasivos⁹. Esta corriente secundaria contiene mayor cantidad de radicales libres (RL)¹⁰ y gran cantidad de

sustancias cuya toxicidad es tan importante como las de la *corriente principal*, lo que podría explicar patologías que aparecen en fumadores pasivos, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma bronquial, enfermedades cardiovasculares, CP en adultos no fumadores, y otras neoplasias¹¹.

No obstante, sólo entre un 10% a un 15% de los fumadores acaban desarrollando un CP. Este hecho y que personas no fumadoras también lo desarrollen, sugiere cierta susceptibilidad genética.

1.2. Diagnóstico

Actualmente, menos del 20% de los CP que se diagnostican se encuentran en estadio I, limitando las posibilidades de curación. La mortalidad a 5 años supera el 80%, debido en gran parte a un diagnóstico tardío con presencia de metástasis, recidiva tras cirugía o la escasa eficacia mostrada frecuentemente por la quimioterapia¹².

El pronóstico de la enfermedad no ha variado sustancialmente, aunque sí parece apreciarse un incremento de la supervivencia en los últimos años gracias al desarrollo de nuevos fármacos y una ligera disminución de la mortalidad probablemente por la disminución en el consumo de tabaco, según se muestra en el informe del National Cancer Institute de 2013¹³.

A día de hoy, el diagnóstico se realiza mediante técnicas de imagen (radiología convencional de tórax (RX), tomografía computerizada (TC), resonancia magnética nuclear (RMN), tomografía por emisión de positrones (PET), ecografía transtorácica) y por

métodos de diagnóstico histológico (citología de esputo, broncoscopia, punción-aspiración con aguja fina (PAFF) y ecobroncoscopia (EBUS), mediastinoscopia, pleuroscopia y toracotomía). Generalmente estos métodos se activan cuando ya existe sintomatología, lo que habitualmente tiene lugar cuando la enfermedad se encuentra en fase avanzada.

Los resultados obtenidos en cuanto a supervivencia son desalentadores, con un índice de mortalidad elevadísimo y que apenas se han podido mejorar en décadas (figura 2). Únicamente entre un 1% y 10% de los pacientes diagnosticados sobreviven a los 5 años, siendo la resección quirúrgica el principal tratamiento curativo de la enfermedad cuando todavía está localizada, llegando a ofrecer la posibilidad de curación entre el 60% y 80% de los casos^{14,15, 16}.

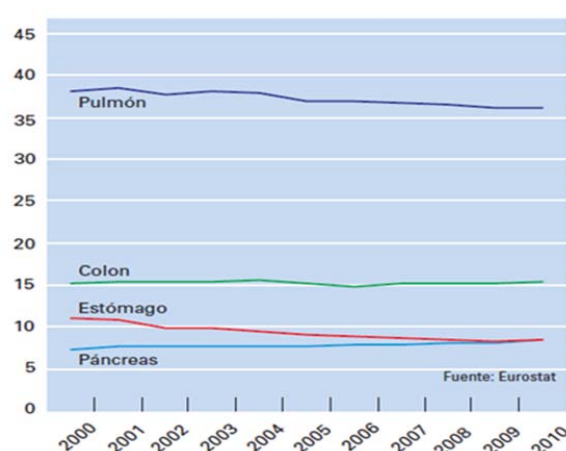


Figura 2. Tasa de mortalidad de cáncer en España por 100.000 habitantes. Tomado de España y la UE: una comparativa sobre la mortalidad por cáncer. Cifras INE. Boletín informativo del Instituto Nacional de Estadística. 2012

1.3. Alteraciones genéticas en el cáncer de pulmón

En el CP se han descrito multitud de alteraciones genéticas. La mayoría de ellas son anormalidades moleculares acumuladas a lo largo de varios años tras la exposición al humo del tabaco y que persisten durante mucho tiempo después del abandono del hábito de fumar¹⁷.

De forma general, existen 2 grandes grupos de genes implicados en la carcinogénesis pulmonar:

1. *Proto-oncogenes* (cuya función biológica es la activación del crecimiento y división celular). Genéticamente son dominantes, por lo que cualquier mutación en un alelo conlleva el desarrollo de la alteración provocando una sobreexpresión de proteína codificante.
2. *Genes supresores de tumores* (inhiben el crecimiento y división celular). Genéticamente son recesivos, por lo que hace falta la alteración de los dos alelos para desarrollar su disfunción. La pérdida de heterocigosidad (LOH) es un ejemplo, donde la pérdida de función se llega mediante una mutación puntual en un alelo y pérdida de secuencia en el otro.

Se han descrito varias LOH en genes supresores de tumores de pulmón como son en el p53, p16, PTEN, RB, SMAD2 y SMAD4, FHIT. De ellos el más importante es la mutación del p53 presente en 80-100% de los casos en carcinoma microcítico de pulmón (ICP) y entre un 50-80% de los no microcíticos (NICP)^{18,19}. Sanz-Ortega *et al.*²⁰ describen

una alta incidencia de LOH en varios genes supresores de tumores en células tumorales y peritumorales aparentemente sanas. Tseng *et al.*²¹ describen varias zonas microsatélites donde las LOH están relacionadas con un peor pronóstico del CP.

Otra alteración molecular descrita en el CP es la inestabilidad microsatélite que provoca múltiples errores en la replicación del ADN bien por mutaciones, bien por silenciamiento de genes reparadores del ADN (MLH1, MLH2, PMSL1, PMSL2 y MSH6). Esta falta de reparación favorece la carcinogénesis²².

La hipermetilación de la región promotora silencia genes supresores²³, la actividad de la telomerasa, que se asocia a la proliferación celular y estadio avanzado de la enfermedad, se ha descrito en un 80-85% de los NICP y en un 100% de los ICP. Éstas son otras de las alteraciones frecuentes en el CP.

En pacientes con NICP se han descrito mutaciones somáticas del gen EGFR que responden a tratamientos con inhibidores de tirosina-quinasa²⁴. Además de esta mutación, reordenamientos entre los genes EML4-ALK también se han descrito en pacientes no fumadores con NICP, lo que permite identificar otro grupo de pacientes que se benefician de una nueva terapéutica como *crizotinib*, inhibidores de ALK^{25, 26, 27}. Estas mutaciones, fácilmente identificables, se encuentran en un 15 % de todos los NICP descritos en algunas poblaciones asiáticas.

1.4. Clasificación histológica del cáncer de pulmón y clasificación TNM

En la tabla 2 queda recogida la clasificación histológica para tumores pulmonares, malignos y benignos.

Tabla 2 Clasificación histológica de tumores pulmonares. La numeración corresponde al comportamiento biológico se codifica en: /3 para los tumores malignos; /2 para las neoplasias in situ; /1 para el comportamiento indeterminado o borderline; /0 para los tumores benignos. Tomado de Travis et al , 2004.²⁸

TUMORES EPITELIALES MALIGNOS		Tumores mesenquimales	
		Hemangioendotelioma epiteliode	9133/1
Carcinoma de células escamosas	8070/3	Angiosarcoma	9120/3
Carcinoma escamoso papilar	8052/3	Blastoma pleuropulmonar	8973/3
Carcinoma escamoso células claras	8084/3	Condroma	9220/0
Carcinoma escamoso células pequeñas	8073/3	Tumor miofibroblástico peribronquial congénito	8827/1
Carcinoma escamoso basaloide	8083/3	Linfangiomatosis pulmonar difusa	
		Tumor miofibroblástico inflamatorio	8825/1
Carcinoma de células pequeñas	8041/3	Linfangioleiomiomatosis	9174/1
Combinado de células pequeñas	8045/3	Sarcoma sinovial	9040/3
		Monofásico	9041/3
Adenocarcinoma	8140/3	Bifásico	9043/3
Adenocarcinoma subtipo mixto	8255/3	Sarcoma de la arteria pulmonar	8800/3
Acinar	8550/3	Sarcoma de la vena pulmonar	8800/3
Papilar	8260/3		
Bronquioloalveolar	8250/3	TUMORES EPITELIALES BENIGNOS	
No mucinoso	8252/3		
Mucinoso	8253/3	Papilomas	
Indeterminado	8254/3	Papiloma de células escamosas	8052/0
Adenocarcinoma sólido con producción de mucina	8230/3	Exofítico	8052/0
Adenocarcinoma fetal	8333/3	Invertido	8053/0
Carcinoma mucinoso o coloide	8480/3	Papiloma glandular	8260/0
Cistoadenocarcinoma mucinoso	8470/3	Papiloma mixto escamoso y glandular	8560/0
Adenocarcinoma células en anillo de sello	8490/3		
Adenocarcinoma de células claras	8310/3	Adenomas	
		Adenoma alveolar	8251/0
Carcinoma de células grandes	8012/3	Adenoma papilar	8260/0
Carcinoma neuroendocrino de células grandes	8013/3	Adenomas de tipo glándula salivar	
Carcinoma neuroendocrino combinado de células grandes	8013/3	Adenoma mucoglandular	8140/0
Carcinoma basaloide	8123/3	Adenoma pleomórfico	8940/0
Carcinoma tipo - linfopitelioma	8082/3	Otros	
Carcinoma de células claras	8310/3	Cistoadenomamucinoso	8470/0
Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide	8014/3		
		TUMORES LINFOPROLIFERATIVOS	
Carcinoma adenoescamoso	8560/3	Linfoma de células B de la zona marginal de tipo MALT*	9699/3
Carcinoma sarcomatoide	8033/3	Linfoma difuso B de células grandes	9680/3
Carcinoma pleomórfico	8022/3	Granulomatosis linfomatoidea	9766/1
Carcinoma de células fusiformes	8032/3	Histiocitosis de células de Langerhans	9751/1
Carcinoma de células gigantes	8031/3		
Carcinosarcoma	8980/3	MISCELÁNEA	
Blastoma pulmonar	8972/3		
		Hamartoma	
Tumor carcinoide	8240/3	Hemangiomaesclerosante	8832/0
Carcinoide típico	8240/3	Tumor de células claras	8005/0
Carcinoide atípico	8249/3	Tumor de células germinales	
		Teratoma maduro	9080/0
Tumores tipo glándulas salivares		Teratomainmaduro	9080/3
Carcinoma mucoepidermoide	8430/3	Otros tumores germinales	
Carcinoide quístico	8200/3	Timoma intrapulmonar	8580/1
Carcinoma epitelial-mioepitelial	8562/3	Melanoma	8720/3
		TUMORES METASTÁSICOS	
Lesiones preinvasivas			
Carcinoma escamoso in situ	8070/2		
Hiperplasia adenomatosa atípica			
Hiperplasia pulmonar difusa idiopática de células neuroendocrinas			

*MALT:Mucosa associated lymphoid tissue.

En la tabla 3 queda reflejada la clasificación TNM que actualmente está vigente.

Tabla 3. Séptima edición de clasificación TNM para cáncer de pulmón. 2009

<p>Tamaño del tumor primario (T):</p> <p>T0 - No hay signos de un tumor primario.</p> <p>TX - Cáncer oculto, demostrado en la citología del lavado bronquial pero no radiológicamente ni en la fibrobroncoscopia. Las secreciones broncopulmonares contienen células malignas pero no hay otros datos de la existencia de un cáncer de pulmón.</p> <p>TIS - Carcinoma <i>in situ</i></p> <p>T1 – Subdividido en :</p> <p>T1a: tumor ≤ 2cm</p> <p>T1b: tumor entre [2, 3) cm</p> <p>Tumor rodeado por tejido pulmonar o pleural visceral y sin invasión proximal al bronquio lobar en la fibrobroncoscopia. También se clasifican en T1 los tumores poco frecuentes, superficiales, de cualquier tamaño, con invasión limitada a la pared bronquial que se extienden proximalmente al bronquio principal.</p> <p>T2 - Tumor mayor de 3 centímetros de dimensión mayor o tumor de cualquier tamaño que invade la pleura visceral o con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar. En la broncoscopia, la extensión proximal del tumor puede limitarse al bronquio lobar o estar al menos a 2 cm de la carina. La atelectasia o la neumonitis obstructiva no deben afectar a todo un pulmón.</p> <p>T3 - Tumor mayor de 7cm, o de cualquier tamaño con extensión directa a la pared costal (incluidos los tumores de la cisura superior) <u>diafragma</u>, <u>pleura</u> mediastínica o pericardio, sin afectación del <u>corazón</u>, grandes vasos, <u>tráquea</u>, <u>esófago</u>, cuerpos vertebrales o un tumor del bronquio principal a menos de 2 cm de la carina, sin infiltración de la misma. La atelectasia afecta a todo un pulmón. Existe derrame pleural no maligno.</p> <p>T4 - Tumor de cualquier tamaño con infiltración del mediastino o del corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpos vertebrales o carina o con derrame pleural maligno. Los derrames pleurales no hemáticos ni exudativos y con varios estudios citológicos negativos no se clasifican como malignos con fines de determinación del estadio.</p>	<p>Ganglios linfáticos regionales (N):</p> <p>N0 - Sin metástasis demostrables en los ganglios linfáticos</p> <p>N1 - Metástasis en los ganglios linfáticos peribronquiales o hiliares ipsolaterales, o ambos, incluyendo la extensión directa del tumor.</p> <p>N2 - Metástasis en los ganglios mediastínicos o subcarínicos ipsolaterales.</p> <p>N3 - Metástasis en los ganglios mediastínicos o hiliares contralaterales, escalénico ipso o contralateral o supraclaviculares.</p> <p>Metástasis a distancia (M):</p> <p>M0 - Sin metástasis a distancia conocidas.</p> <p>M1a</p> <p>M1b - Metástasis a distancia presentes, especificando su localización por ejemplo en cerebro.</p> <p>Estadificación del cáncer de pulmón</p> <p>Carcinoma oculto</p> <p>TX</p> <p>N0</p> <p>M0</p> <p>Estadio 0</p> <p>TIS</p> <p>Carcinoma <i>in situ</i></p> <p>Estadio I</p> <p>IA T1 N0 M0</p> <p>IB T2 N0 M0</p> <p>Estadio II</p> <p>IIA T1 N1 M0</p> <p>IIB T2 N1 M0/T3 N0 M0</p> <p>Estadio IIIa</p> <p>T3 (ó T1 ó T2 con N2)</p> <p>N0, N1 ó N2</p> <p>M0</p> <p>Estadio IIIb</p> <p>Cualquier T</p> <p>N3 (ó cualquier N con T4)</p> <p>M0</p> <p>Estadio IV.</p> <p>Cualquier T</p> <p>Cualquier N</p> <p>M1.</p>
---	---

La séptima edición de la clasificación TNM del cáncer de pulmón es la primera que se basa en datos realmente internacionales de pacientes tratados de muy diversa manera; donde se da más importancia al tamaño tumoral, reconcilia la clasificación de los tumores con nódulos adicionales con su pronóstico real y adapta la clasificación de la diseminación pleural a su pronóstico.²⁹

1.5. Diagnóstico precoz del cáncer de pulmón

De la experiencia clínica acumulada, junto con los datos expuestos en los epígrafes anteriores, se hace necesaria de búsqueda de métodos de cribado poblacional que ofrezcan la posibilidad de un diagnóstico precoz o temprano de la enfermedad, y cuyo objetivo final sea disminuir la mortalidad.

Según la Real Academia Española, el diagnóstico es el ***“Arte o acto de conocer la naturaleza de una enfermedad mediante la observación de sus síntomas y signos”***. Cuando se refiere a “Diagnóstico Precoz”, lo define como ***“relativo a las etapas tempranas de una enfermedad o proceso orgánico”***³⁰. Es decir, el diagnóstico precoz de cáncer de pulmón es llegar a una detección de la enfermedad en estadios tempranos, habitualmente antes de que los síntomas clínicos se manifiesten.

En los años 70 surgieron los primeros intentos de cribado con la radiografía convencional de tórax y la citología de esputo³¹.

En 1991 se publican los resultados de tres estudios randomizados a gran escala patrocinados por *The National Cancer Institute* de EEUU realizados en el *Johns Hopkins Medical Institutions*, *The Memorial Sloan–Kettering Cancer Center*, y la Clínica Mayo con personas de elevado riesgo y de un cuarto estudio realizado en Checoslovaquia³² con una metodología semejante. La metodología de cribado se basó en la aplicación de la radiografía de tórax y la citología de esputo, centrando el estudio en personas fumadoras asintomáticas y con estado psicofísico aceptable y que permitiera, en su caso, el tratamiento quirúrgico. A los grupos de estudio de *Johns Hopkins Medical* y *Memorial*

Sloan–Kettering Cancer Center se les realizó una RX de tórax anual más una citología de esputo cada 4 meses, mientras que al grupo control se les ofreció la realización de una radiografía anual. En la Clínica Mayo, se realizó una RX de tórax y citología de esputo cada 4 meses a los incluidos en el grupo de estudio, frente a un grupo control en el que se realizaron ambas pruebas al menos una vez al año. Aun cuando las características del grupo control en este estudio adolecen de falta de rigor, se demostró un aumento en la detección de CP en estadio precoz en personas asintomáticas con factores de riesgo por tabaco, resecables en la práctica totalidad de los casos, así como una supervivencia superior en el grupo de estudio frente al grupo control. La citología de esputo no demostró ninguna ventaja en cuanto a la disminución de la mortalidad. A pesar de la esperanza suscitada, en ninguno de los cuatro estudios se pudo demostrar diferencia en la mortalidad entre ambos grupos, estudio y control³³.

A raíz de estos estudios se llegó a la conclusión de que recomendaciones para los programas de detección precoz eran ineficaces, pues aunque si aumentaba la supervivencia y se detectaban más tumores en estadios tempranos, al final no se reducía la mortalidad, y además generaba falsos positivos lo que suponía la realización de pruebas de diagnóstico invasivas y tratamientos innecesarios. Estas conclusiones estaban basadas en 3 sesgos difíciles de demostrar hasta el momento:

- ✓ **Sobrediagnóstico**: consiste en el diagnóstico de lesiones de tamaño pequeño cuyo crecimiento es muy lento y que podrían permanecer asintomáticas durante toda la vida del paciente. Habrían pasado desapercibidas si no hubieran sido detectadas por

el programa de cribado (figura 3)^{34,35}.

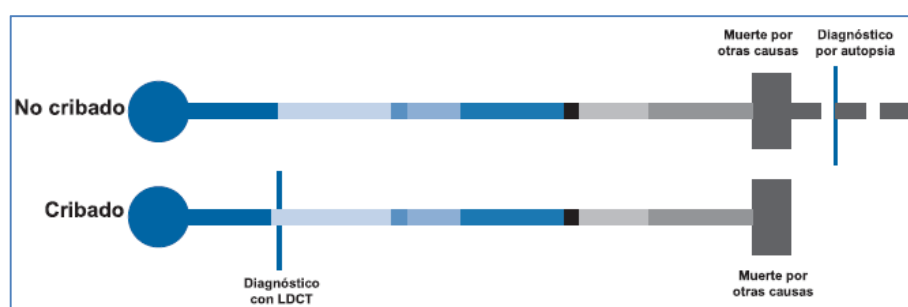


Figura 3. Sobrediagnóstico. Detección de tumores mediante cribado que permanecerían asintomáticos hasta que haya muerte por otras causas. Modificado de Black C et al. 2006³⁴.

- ✓ Lead Time Bias:(adelanto de diagnóstico): Existe un aumento de la supervivencia porque el diagnóstico se hace precozmente por un programa de cribado (figura4). Explicaría que, en algunos casos en los cuales el cáncer es motivo de muerte el hecho de haberlo diagnosticado antes aumentaría el “tiempo de supervivencia”, pero manteniendo invariable la mortalidad.

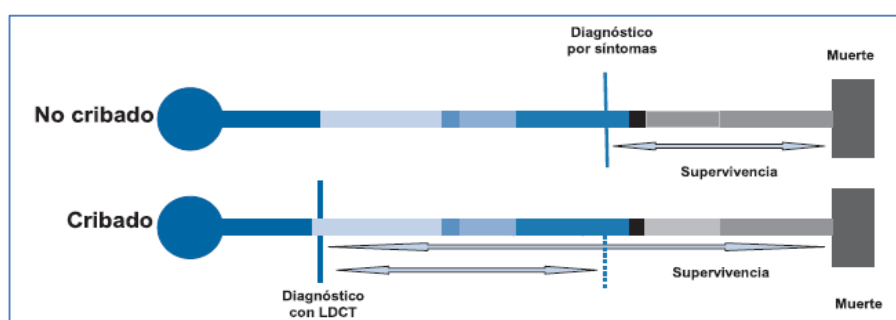


Figura 4. Lead time bias. Con el cribado, aumenta la supervivencia aunque no retrasa la muerte. Modificado de black c et al. 2006³⁴.

- ✓ Length time bias(duración de la enfermedad): En el diagnóstico precoz se detectan aquellos casos cuya progresión de la enfermedad es más lenta aumentando así la supervivencia, mientras que los casos más agresivos son

menos detectados, y la supervivencia se ve disminuida (figura5), sin que forzosamente tenga que influir en la mortalidad.

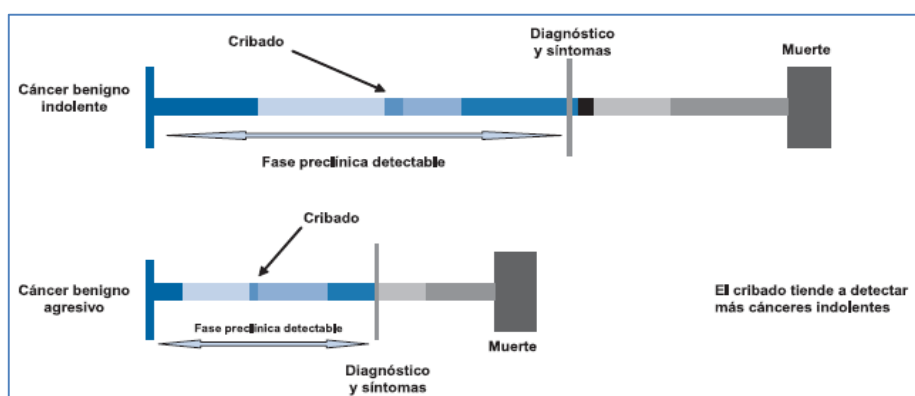


Figura 5. Length time bias. El cribado detecta los tumores de progresión más lenta modificado de Black C *et al.* 2006³⁴.

Estos estudios fueron revisados posteriormente por presentar serios problemas metodológicos. Cabe destacar la falta de un grupo CONTROL riguroso, pues en los tres casos los grupos controles se asemejaban bastante a los grupos de estudio, al haber aconsejado la realización de una RX de tórax y citología anual, siguiendo la práctica clínica aceptada por las sociedades americanas de la época, y describiendo los hallazgos en este grupo como diagnóstico basado en los síntomas, cuando no siempre fue así. Además los estudios se restringieron a hombres, no teniendo en cuenta que en las mujeres la incidencia y mortalidad estaba aumentando ya considerablemente.

Dominioni *et al.*³⁶ critican muy seriamente los sesgos anteriormente mencionados como explicación de los hallazgos en los programas de cribado. En su experiencia clínica, la tasa de supervivencia a 5 años de los pacientes con NICP detectados en estadio I y resecados radicalmente, alcanza entre el 60% y 80 %, mientras que la supervivencia en los

casos NICP en estadio I y no sometidos a cirugía disminuye al 10 %. En todo caso, sus hallazgos son muy llamativos.

En 1999, es decir, 27 años después de la puesta en marcha de los primeros programas de cribado descritos anteriormente, Henschke *et al.*³⁷ publicaron su primer trabajo en diagnóstico precoz de CP aplicando TC de baja radiación (TCBR) dentro del programa *Early Lung Cancer Action Project* (ELCAP). En este trabajo se evaluaban las personas incluidas al inicio (línea basal) y anualmente. Se incluyeron en el estudio 1000 voluntarios con alto riesgo de CP, asintomáticos, con buen estado físico, mayores de 60 años con un consumo de tabaco mayor de 10 paquetes por año. Se les realizó una RX y un TCBR inicialmente, y se siguió el protocolo establecido por ELCAP para el seguimiento del nódulo pulmonar solitario (NPS) no calcificado (figura6) repitiendo las exploraciones anualmente, en el caso de no hallar imágenes sugestivas o dudosas de tumor. Se detectaron 233 (23%) NPS no calcificados mediante TCBR frente a 68 (7%) por RX. Se biopsiaron 28 de los detectados mediante TCBR y de ellos, 27 (2,7%) resultaron ser malignos (el otro fue un nódulo benigno), frente a 7 (0,7%) detectados por RX. De los 27 tumores detectados, 26 fueron resecados. En tres casos dudosos se llevó a cabo biopsia, resultando ser todas negativas para malignidad. Se concluyó que el TCBR puede detectar pequeños nódulos no calcificados, y por lo tanto detectar el CP en etapas potencialmente más curables.

En 2001 Henschke *et al.*³⁸ publican un trabajo de incidencia de CP con cribaje anual con TCBR. Realizado sobre el mismo grupo de personas incluidas inicialmente, se eliminaron los diagnosticados de cáncer en el corte de prevalencia y los que fallecieron

por otras causas, no quisieron seguir, o se perdieron, quedando al final un total de 841 personas. Se diagnosticaron 7 tumores, 6 de ellos NICP y 1 microcítico (ICP), 5 de ellos en estadio pIA y 1 en estadio pIIIA.

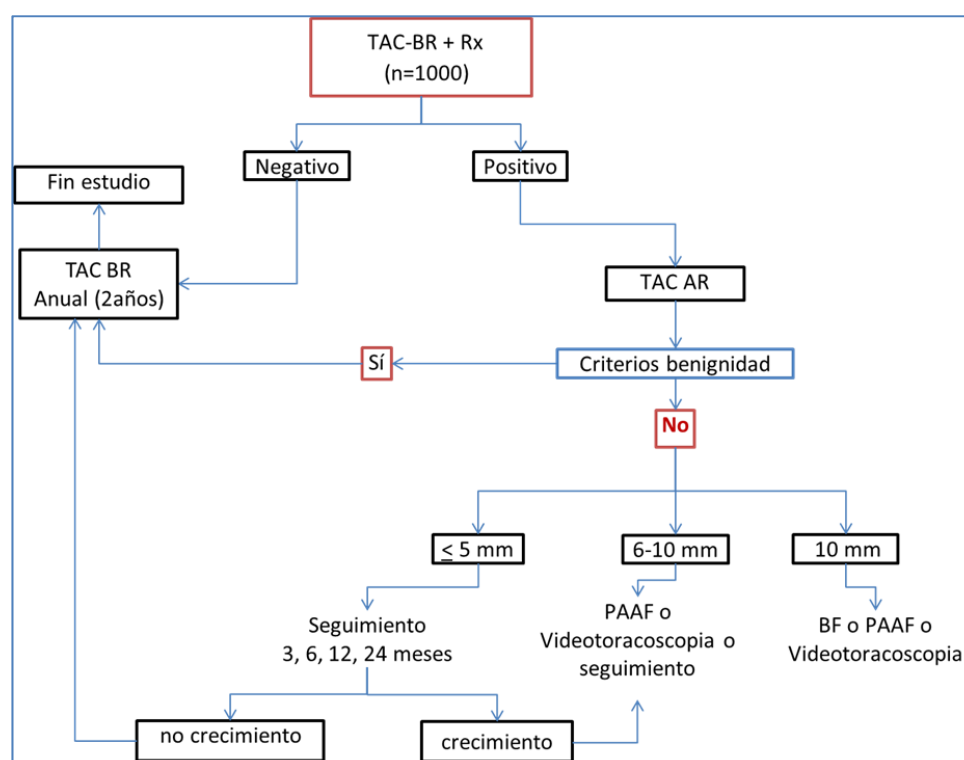


Figura 6. Seguimiento del NPS. ELCAP

En 2002, Swensen SJ *et al.*³⁹ realizan un estudio de prevalencia, parecido al de Henschke, sobre un total de 1520 personas fumadoras con un índice tabáquico acumulado (IPA) de más de 20 y de edad superior a 50 años, obtiene unos resultados parecidos, diagnosticando 25 CP, 12 de ellos en estadio pIA. Llama la atención que fueron operados 7 nódulos benignos (falsos positivos), y el elevado porcentaje de adenocarcinomas que se obtuvieron.

Se han realizado estudios similares en los que cabe destacar los de Nowa *et al.*⁴⁰,

Bastarrika *et al.*⁴¹, Callol *et al.*⁴² y ELCAP⁴³, cuyos resultados y rentabilidad se recogen en la tabla 4.

Tabla 4. Diferentes estudios de DPCP mediante TCBR

	N	CP DETECTADOS	ESTADIO IA	RENTABILIDAD
HENSCHKE	1000	34	28	3.4%
SWENSEN	1520	23	12	1.5%
NOWA	7956	40	32	0.5%
BASTARRIKA	911	14		1.5%
CALLOL	466	5	5	1.1%
ELCAP	27456	376	300	1.4%

Según se muestra en el Informe de Evaluación de Tecnologías Sanitarias - avalia-t Núm. 2007/06⁴⁴ de 2009, para el cribado del CP, estos estudios presentan serias limitaciones metodológicas. Por ejemplo, el no tener un grupo control, un período de seguimiento adecuado que permita conocer la verdadera efectividad del cribado de CP, ya que en la mayoría de éstos el periodo de seguimiento es inferior a 5 años, o la utilización de diferentes criterios de selección para población de riesgo (rango de edad, hábito tabáquico, etc.). Además, en estos estudios se refleja que no existen protocolos establecidos acerca de cómo manejar los nódulos sospechosos y tampoco valoran las repercusiones sobre la seguridad de los pacientes de los sucesivos cribados con TC (sometiéndolos quizás a un exceso de radiación innecesaria), ni tampoco hay un estudio exhaustivo sobre coste – efectividad.

El sobrediagnóstico está presente en muchos trabajos. El número de falsos positivos es superior en el TCBR que en la radiografía de tórax, dado que es una técnica

cuatro veces más sensible, y es mayor aún en el cribado basal que en las sucesivas repeticiones (5-50 % vs. 3-12 %, respectivamente)⁴⁵. Este sesgo es muy difícil de eliminar para el CP⁴⁶.

Los estudios realizados hasta ese momento no alcanzaron evidencia suficiente para su recomendación en la práctica clínica. A este respecto, en 2009 la American Cancer Society indica que el cribado debería ser realizado exclusivamente en aquellos casos en los que personas con riesgo elevado lo desearan⁴⁷.

En 2012 se publican los resultados del estudio del National Lung Screening Trial Research⁴⁸ con un total de 53454 voluntarios divididos en dos grupos, de estudio y control, a los que se les realizó un TCBR al grupo de estudio, y sólo una radiografía de tórax al grupo control, con un seguimiento de 6,5 años. Por primera vez sus resultados muestran una reducción de la mortalidad en un 20% ($p=0.004$) entre el grupo sometido a técnica de cribado con TCBR frente al grupo control.

Este estudio, fundamental en la valoración de las técnicas de imagen para cribado de CP, ha servido de base para el desarrollo de una guía de práctica clínica basada en la evidencia aceptada por varias sociedades científicas americanas de prestigio (*American Cancer Society, American College of Chest Physicians, American Society of Clinical Oncology y National Comprehensive Cancer Network*), según se recoge en una revisión sistemática publicada en JAMA⁴⁹ en 2012. En ella, se hace una revisión de 591 artículos publicados en inglés acerca del diagnóstico precoz de CP con TCBR, seleccionando 8 ensayos aleatorios y 13 estudios de cohortes. Se evalúan los beneficios y riesgos del cribado con esta técnica. Como conclusiones se extraen que las personas de alto riesgo

para desarrollar CP se verían beneficiadas aun existiendo riesgos potenciales como los falsos positivos, calidad de vida para los falsos positivos, el sobrediagnóstico, complicaciones en los procedimientos en el diagnóstico y la dosis de radiación recibida.

Basado en los resultados del *National Lung Screening Trial Research*⁴⁸ y recomendaciones de las sociedades científicas americanas, Pyenson *et al.*⁵⁰ en un estudio actuarial publicado en 2012 calculan que el cribado de CP en población de riesgo supondría un incremento del coste de \$1/mes por asegurado. El coste por año de vida salvado sería inferior a \$19.000, cantidad comparable con el cribado para el cáncer cérvix, mama o colorrectal.

Por tanto, la única técnica aceptada en la actualidad como método de cribado de CP para población de riesgo es el TCLR. Al efecto de aumentar su rentabilidad y disminuir los riesgos y costes, es preciso la búsqueda de nuevos parámetros que ayuden a establecer criterios de inclusión más acotados. En este aspecto, el empleo de biomarcadores podría contribuir a este fin.

1.6. Metabólica, metabonómica: biomarcadores

La metabolómica es el análisis sistemático y completo de un gran número de compuestos de bajo peso molecular (metabolitos) a partir de un fluido biológico. El metaboloma es el conjunto de todos los metabolitos en una célula, tejido, órgano u organismo que son producto de los procesos celulares. Es un campo emergente de la investigación “ómicas” cuyo objetivo es identificar y cuantificar todos los metabolitos en un sistema biológico para poder descubrir enfermedades, factores de riesgo y determinar

biomarcadores.

La idea del diagnóstico a partir de los metabolitos se remonta al menos a la antigua Grecia y a la Edad Media con el uso de tablas de orina para diagnosticar enfermedades⁵¹. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas GC-MS, RMN y la secuenciación del genoma humano⁵² hacen que resurja con fuerza como alternativa para el diagnóstico precoz de enfermedades. Esto va unido al avance en paralelo de las herramientas informáticas y de tratamiento estadístico necesario para manejarla complejidad de datos.

Dentro del estudio de los metabolitos se acuña el término *metabonomica* para definir " *a la medición cuantitativa de la respuesta metabólica de naturaleza dinámica y multiparamétrica de los sistemas vivos ante estímulos patofisiológicos, o bien, ante la modificación genética*". El origen de la palabra es del griego *μεταβολή* que significa cambio y *-nomos* que significa conjunto de reglas o leyes⁵³. Este término fue iniciado por Jeremy Nicholson en el Imperial College London y ha sido usado en toxicología, diagnóstico de enfermedades y demás campos. Históricamente, el método de la metabonomica fue uno de los primeros en aplicar la visión de la biología de sistemas para los estudios del metabolismo⁵⁴.

Podríamos decir que metabolómica y metabonomica son métodos de estudios de perfiles metabólicos que ofrecen la oportunidad de identificar *biomarcadores* o patrones de cambios de biomarcadores relacionados con la una enfermedad, un fármaco o cualquier agente externo en las muestras de fluidos biológicos, tales como la orina o la sangre, que puede recogerse con relativa facilidad.

Si bien en la metabolómica tiene un mayor énfasis en el perfilado metabólico a nivel celular o de órganos y su campo de trabajo primario es el metabolismo endógeno normal, en la metabonomía se incluye información acerca de las perturbaciones en el metabolismo causadas por factores ambientales (incluyendo dietas y toxinas), procesos de enfermedad y contribuciones por influencias de tipo extragenómico, como los componentes de la flora intestinal. Esto no es una diferencia trivial; los estudios metabolómicos deberían, por definición, excluir las contribuciones de fuentes extragenómicas, ya que esas son externas en relación al sistema estudiado. Sin embargo, en el campo de investigación de enfermedades humanas, se usan ambos términos, siendo en ocasiones sinónimos.

El objetivo de los estudios metabolómicos es la identificación de biomarcadores. Un **biomarcador** o **marcador biológico** es aquella molécula que indica un *estado biológico*. Debe poder medirse objetivamente y ser evaluado como un indicador de un proceso biológico normal, un estado patológico o como respuesta a un tratamiento con fármacos.

Las características que debe reunir un biomarcador para poder ser empleado en métodos de cribado son:

- Diferente expresión en células pre-neoplásicas en relación a las normales
- Estar presente en muestras obtenidas de forma mínimamente invasiva.
- Ser un sistema bien establecido para cuantificar sus niveles.
- Ser estable en el tiempo y con el procesamiento de las muestras.
- Ser un método rutinario y automatizado de análisis.

Hasta el momento, el empleo de biomarcadores no puede considerarse como método de cribado de manera individualizada, pero sí contribuir como prueba de apoyo a las técnicas de imagen en el diagnóstico precoz, pudiendo evitar la realización de determinadas pruebas invasivas innecesarias, tal y como se recoge en la revisión sistemática que Aberle *et al.*⁵⁵ publican en 2008 sobre biomarcadores moleculares como pruebas diagnósticas en el CP.

La citología de esputo ya fue empleada anteriormente con resultados muy limitados^{31,33,56}.

En la primera década de este siglo se desarrollan trabajos con biomarcadores en los que se estudian alteraciones específicas en microsatélites de ADN donde se pueden observar diferencias entre el ADN de tejido normal y el tumoral^{57,58}. La proteómica, con la determinación de determinados anticuerpos específicos⁵⁹ presenta un gran potencial para el diagnóstico de tumores tanto invasivos como preinvasivos, pero de difícil aplicación clínica por su complejidad⁶⁰.

Actualmente se sigue investigando en posibles marcadores en esputo, secreciones bronquiales o aire exhalado que podrían ayudar en la detección precoz del CP. Por el momento, cualquiera de ellas está lejos de poder utilizarse en el cribado, aunque sí podrían contribuir en la selección de los criterios para su inclusión en programas de diagnóstico precoz.

Es de especial interés el análisis del aire exhalado como herramienta futura para la detección precoz del CP. Es una metodología no invasiva que trata de establecer

diferencias entre muestras de aire de población con y sin cáncer, tras los efectos del estrés oxidativo. Actualmente se están desarrollando tres vías de análisis del aire exhalado:

- Condensado de aire exhalado (CAE)⁶¹: Contempla la posibilidad de efectuar el análisis de un gran abanico de mediadores de la inflamación, estrés oxidativo e incluso marcadores tumorales en cualquier sujeto y sin necesidad de una gran colaboración. Hay que tener en cuenta su "contaminación" por sustancias procedentes de la orofaringe, boca e incluso el tubo digestivo superior. Esto dificulta la interpretación de los resultados del análisis⁶². El CAE contiene macromoléculas, como por ejemplo proteínas, que pueden ser empleadas como herramienta para el diagnóstico de problemas pulmonares e incluso usadas como potenciales pruebas de cribado.
- Nariz Electrónica: Son multisensores sensibles a diferentes compuestos y que emulan a la nariz biológica. Son sistemas caros y difíciles de utilizar. Dragonieri *et al.*⁶³ emplearon una nariz electrónica comercial, *Cyranose 320*, para diferenciar entre pacientes con CP y voluntarios sanos (10 y 20 respectivamente) con una sensibilidad del 85%. Machado *et al.*⁶⁴ usaron otra nariz electrónica para diferenciar entre pacientes con y sin CP (14 y 62 sujetos respectivamente) con una sensibilidad del 71.4%. Di Natale *et al.*⁶⁵ identificaban el 94% de personas (35 con cáncer, 18 sanos y 9 después de cirugía). Uno de los grandes problemas de estos estudios es la falta de reproducibilidad, bien sea por las condiciones de diseño o por la fabricación de los sensores electrónicos. En cualquier caso, una baja reproducibilidad implica

que los diferentes estudios con narices electrónicas no serían comparables entre sí.

- Análisis cromatográfico del aire exhalado. Primeros estudios de compuestos orgánicos volátiles (VOC) identificados mediante análisis cromatográfico mostraban una sensibilidad y una especificidad superiores al 90% en ambos casos para el CP^{66,67}. Estos estudios resultaron muy atractivos y sentaron las bases de multitud de estudios realizados hasta la fecha.

En cualquiera de los tres casos existen problemas de contaminación en las determinaciones debido a diversas causas, pero principalmente por contaminantes ambientales que se inhalan continuamente, así como medicamentos, ingesta de comida y bebidas o el empleo de productos de higiene bucal.

Sin embargo, la técnica de cromatografía de gases (GC) ofrece la posibilidad de estudiar en profundidad una gran cantidad de compuestos originados en el estrés oxidativo, todavía poco explorado. Dado la facilidad de obtención de muestra y la ausencia total de morbilidad, su posible aplicación como cribado podría estar justificada.

1.7. Estrés oxidativo. Radicales libres. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

El oxígeno imprescindible para la vida, también puede ser fuente de enfermedad a través de una producción incontrolada de radicales libres de oxígeno (RLO) que provocan daños irreversibles estructurales y funcionales de las células, tales como alteraciones en proteínas esenciales, peroxidación lipídica, ruptura de cadenas y modificación de las bases

nitrogenadas del ADN, un aumento intracelular elevado de Ca^{2+} libre y, en ciertos casos, apoptosis o necrosis^{68,69}.

El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) o de nitrógeno (RNS) y la capacidad de un sistema biológico de detoxificar rápidamente los compuestos intermedios y de reparar el daño causado. Este desequilibrio puede ser debido a un aumento en la concentración de ROS intracelular o por una disminución de los agentes antioxidantes que los degradan.

Se han descrito numerosos procesos y enfermedades donde está implicado el estrés oxidativo, bien como causa principal o bien aumentando las complicaciones clínicas, donde destacamos:

- *El envejecimiento, que es un proceso, no una enfermedad, lleva consigo una* acumulación de lesiones orgánicas debidas a RLO, una disminución de las concentraciones de antioxidantes e inactivación de las enzimas detoxificadoras de RLO y una acumulación de proteínas oxidadas no degradadas.
- Enfermedades del tejido nervioso tales como *Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica*. *El sistema nervioso* parece ser un blanco perfecto de ataque para los RL por sus características químicas, como son el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, altas concentraciones de hierro y bajo contenido en enzimas antioxidantes.
- *La ateroesclerosis*: Existe una oxidación de determinados aminoácidos de las lipoproteínas, generando LDL oxidadas de carácter citotóxico para el endotelio.

- Otras muchas enfermedades como isquemia o infarto cerebral, traumatismos craneales, artritis reumatoide, síndrome auto inmune, nefrotoxicidad por metales, catarata senil, Insuficiencia renal aguda, crónica y diálisis, diabetes mellitus, hipertensión arterial (aumento de la peroxidación de lípidos, tanto en plasma como en las membranas celulares, así como una disminución de la capacidad antioxidante), cirrosis, insuficiencia hepática y hepatopatía alcohólica.
- Otros procesos y enfermedades, por ejemplo: reoxigenación o reperfusión, desmielinización, distrofia muscular, enfisema pulmonar, amiloidosis, collagenosis, conectivopatías (esclerodermia, enfermedad de Wegener), colitis ulcerosa, demencia senil, dermatitis de contacto, displasia broncopulmonar, distrés respiratorio del adulto, mutaciones, EPOC, síndrome de apnea e hipoapnea obstructiva del sueño, infección pulmonar grave, asma, cáncer de pulmón, enfisema, fibroplasia retrolental, Kawashiorkor, isquemia cerebral, glomerulonefritis, miocardiopatías, insuficiencia cardíaca, muerte súbita cardíaca, porfirias, úlcera péptica, síndromes de ataxia-teleangiectasia, de Down, de Bloom, de Dubin-Johnson-Sprinz, entre otras.^{69,70,71,72,73,74}

1.8. Estrés oxidativo y cáncer

Es de destacar la relación existente entre estrés oxidativo y el cáncer: el desarrollo tumoral es un proceso muy complejo que se caracteriza por la presencia de necrosis celular del tejido sano, crecimiento incontrolado de las células cancerosas y angiogénesis

del área afectada, entre otros muchos fenómenos. Se ha observado la activación temprana de algunos genes que podrían participar en el control de la transcripción de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo tumoral. No hay que olvidar que la transformación oncogénica viene condicionada por la presencia de genes mutados u oncogenes que controlan funciones celulares clave, y esto también puede influenciarse por el estado redox celular. Se han detectado niveles disminuidos de enzimas antioxidantes en diversos tipos de células tumorales así como alteraciones en el estado de los tioles celulares ⁶⁹.

La mayoría de las ROS que se producen en condiciones normales de metabolismo aerobio, lo hacen a niveles bajos y el daño causado a las células es reparado continuamente. Pero también tienen funciones biológicas bien definidas e importantísimas como las de generar descargas oxidativas por parte de los neutrófilos o la inducción de vías de señalización intracelulares relacionadas con el crecimiento ⁷⁴. Una producción excesiva de ROS es tóxica, las especies ión superóxido O_2^- , peróxido de hidrogeno, H_2O_2 , radical hidroxilo OH^\bullet son oxidantes muy potentes que reaccionan con todos los componentes celulares (lípidos, proteínas hidratos de carbono y ADN) inactivando su función ⁷¹, generan necrosis y conducen a un agotamiento de ATP impidiendo la muerte celular por apoptosis, provocando un descontrol de la célula ⁷⁵.

La generación de ROS va unida a la formación de especies reactivas de nitrógeno (RNS) porque el O_2^- puede reaccionar con otros radicales como el óxido nítrico (NO^\bullet) generando peroxinitrito ($OONO^-$), precursor de los RNS ⁷⁶ considerado como uno de los

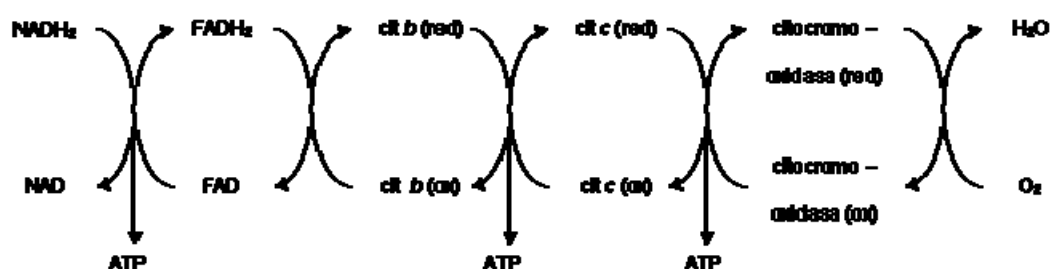
oxidantes biológicos más potentes. Las RNS pueden dañar y matar células por distintos mecanismos: inactivación de los distintos complejos de la cadena respiratoria, daño a proteínas y a lípidos, inhibición de síntesis proteica o de ADN, depleción del glutatión (GSH) o de ATP. En células de mamíferos la principal fuente de RNS, es la oxidación enzimática de L-arginina por la NO sintasa, dependiente de calcio ⁷⁰.

El origen de los ROS puede ser endógeno o exógeno:

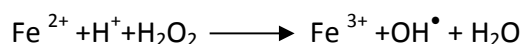
Endógeno:

1. La principal fuente endógena de ROS es la cadena de transporte de electrones que tiene lugar en la **mitocondria**. En su última etapa de fosforilación oxidativa, el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, con la producción de 2 moléculas de agua (figura 7), además de la formación de varias moléculas con diferente grado de oxidación, que pueden entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir RL ⁷¹. Aproximadamente un 3 % de los electrones procedentes del NADH_2 se desvían hacia la formación de ROS.

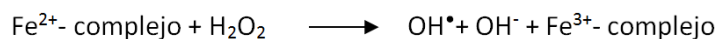
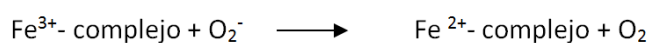
Figura 7. Cadena respiratoria.



Por una parte, el H_2O_2 generado puede reaccionar con metales divalentes (libres o unidos a proteínas) y producir OH^\bullet , vía *reacción de Fenton*:



O bien, puede reaccionar con el grupo prostético de metaloproteínas que contienen átomos de hierro según la *reacción de Haber Weis*:



Otras fuentes son:

- **Peroxisomas** que contienen flavin-oxidasas como acil-CoA oxidasa, genera H_2O_2 tras procesos de β -oxidación de ácidos grasos.
- **Leucocitos polimorfonucleares (PMN)** que poseen en sus membranas la enzima NADPH-oxidasa que produce O_2^- y que en presencia de hierro se transforma en OH^\bullet , que se da particularmente en los procesos inflamatorios.
- enzima **xantina deshidrogenasa** que predomina en los endotelios y genera O_2^- ^{71, 76}.

Exógeno:

El origen exógeno de las ROS puede ser muy diverso. El tabaco, la polución, la ingesta, radiaciones ionizantes (RX, radiaciones gamma...), radiación ultravioleta, generan multitud de ROS. Además, compuestos carcinógenos aromáticos, como el benceno, producen también ROS tras su catabolismo, lo que multiplica su acción destructora ^{75,77}.

En el humo del tabaco se han descrito más de 1000 RL ⁷⁸ y más de 4700 compuestos químicos, gran parte de ellos tóxicos, pero sólo una pequeña fracción ha sido estudiada e incluida en el Grupo I de carcinógenos humanos por la *Agency for Research on Cancer* ⁷⁹. Entre los carcinógenos más importantes identificados en el humo del tabaco se encuentran los hidrocarburos policíclicos aromáticos y las nitrosaminas. A la toxicidad propia de estos compuestos hay que sumarle la de sus metabolitos generados mediante reacciones de oxidación catalizadas por sistemas enzimáticos asociados al citocromo P450 ^{80,81}. Todo lo anterior genera una reacción en cadena, cuya extraordinaria complejidad dificulta los estudios de toxicidad del humo del tabaco.

El organismo posee sistemas enzimáticos capaces de metabolizar todas las sustancias ajenas al organismo, realizándose en 2 fases:

- *Fase I*, catalizada principalmente por el sistema de monooxigenasas dependiente del citocromo P450 (CYP).
- *Fase II*, en la que participan una serie de transferasas que catalizan reacciones de conjugación con diversas moléculas de naturaleza endógena para facilitar su excreción del organismo.

1.9. Mecanismos de neutralización de ROS por el citocromo P450

El citocromo P450 (CYP) (hemoproteína) es la última oxidasa perteneciente a un complejo multienzimático de monooxigenasas que se encuentra presente en diferentes tejidos como el riñón, pulmón, piel, intestino, corteza adrenal, testículos, placenta y otros, pero es particularmente activo en el hígado^{82,83}.

Su actividad es la de participar en el metabolismo de sustratos de naturaleza exógena, reacciones de detoxificación (drogas, pesticidas, procarcinógenos, solventes orgánicos, etc.) y en el metabolismo de sustratos endógenos (colesterol, ácidos biliares, hormonas esteroideas y ácidos grasos)⁸³. A su vez, participa en procesos de activación metabólica, de manera que compuestos inertes y poco reactivos son convertidos en otros de gran reactividad química que son tóxicos para el organismo, capaces de causar graves lesiones a los tejidos o de provocar mutaciones.

Se han descrito más de 160 isoformas de CYP. Son fácilmente inducibles y su expresión y actividad vienen influenciadas por factores como la edad, sexo, dieta, especie, tejido y estado hormonal⁸².

La isoforma CYP2E1 merece una gran atención. Se encuentra principalmente en hígado (alrededor de 7% del CYP total), aunque también está presente en cerebro y pulmón. No sólo participa en el metabolismo del etanol, sino también activando procarcinógenos (N-dimetilnitrosamina, tetracloruro de carbono y benceno). Se ha descrito como una de las enzimas que produce mayor cantidad de ROS (O_2^- y H_2O_2). Los hidrocarburos policíclicos aromáticos del humo del tabaco inducen a CYP1A1 (que se

encuentra en pulmón) y CYP1A2 y posiblemente al CYP2E1. Se ha comprobado que aquellas personas que tienen los genotipos CYP2E1 y CYP1A1, tienen más riesgo de padecer cáncer de pulmón⁸².

Cada persona responde de forma diferente a la acción de determinadas sustancias, esto se debe a la existencia de un polimorfismo genético, que produce variantes genéticas que difieren en su actividad de metabolizar estos compuestos ajenos al organismo⁸⁴.

1.10. Radicales libre y daño tisular

Los RL atacan cualquier molécula oxidándola y haciendo que pierda su función específica en la célula. Se han descrito multitud de modificaciones, las principales quedan recogidas en la tabla 5.

Tabla 5. Alteraciones en las macromoléculas y consecuencias por efecto del ataque de RL.

Macromolécula	Alteración	Consecuencia
Lípidos de membrana ⁷¹	<p>Peroxidación lipídica: reacción en cadena. El ácido graso al oxidarse se convierte en radical de ácido graso y oxida a otra molécula vecina. Se generan numerosos subproductos, hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos.</p> <p>Todos ellos pueden difundir lejos de donde se originaron y causar edema celular e influir en la permeabilidad vascular e inflamación.</p>	<p>Aumento de la permeabilidad: provoca un edema celular y por tanto, muerte celular.</p> <p>Alteración en la interacción con proteínas.</p>
Proteínas ⁷¹	<ul style="list-style-type: none"> • Oxidación de aminoácidos: fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina (preferentemente) • Modificaciones reversibles inducidas por H₂O₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • Entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos. Alteración de la estructura. Pérdida de actividad. • Regulación de la actividad proteica.
ADN ⁷⁵	<p>Oxidación de las bases nitrogenadas y/o desoxirribosa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ruptura de una o de ambas cadenas, aductos entre la base nitrogenada y la desoxirribosa, uniones covalentes con proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Desarrollo de mutaciones y carcinogénesis. • Pérdida de expresión por daño al gen específico. • Ej: modificación de la guanina en 7-hidro-8-oxo deoxignanosina (8-oxo-Gu). Produce un cambio de bases: G por T. La transversión de G:C a T:A, es la mutación más frecuente en el p53.

Además de los antioxidantes que se ingieren en la dieta, las células han desarrollado diferentes sistemas de defensa frente a la formación de RL y los ya formados. Su actividad dependerá de la afinidad hacia los diferentes RL actuando de manera diferente. Los más importantes se recogen en la siguiente tabla 6.

Tabla 6. Principales sistemas de defensa celulares frente a la formación de RL

ENDÓGENOS	SISTEMA ENZIMÁTICO	FUNCIÓN
	Sistema Citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial.	Reducción del 90% de oxígeno en el organismo ⁷¹ .
	Enzima superóxido dismutasa (SOD) (metaloenzima). Diferentes isoformas (dependiendo del ion metálico que contenga en su centro activo): Cu,ZnSOD , (enzima dimérica. En su centro activo tiene un ión de Zn(II) de función estructural y uno de Cu(II) cuya oxidación/reducción es importante para la actividad catalítica de la enzima). (citoplasmática). MnSOD, (mitocondrial) (tetramérica con un ión de Mn(III) por subunidad). FeSOD, Fe/MnSOD y NiSOD ^{70, 71, 76} .	Mantener concentraciones no-tóxicas de O ₂ ⁻ . Dismutación O ₂ ⁻ a H ₂ O ₂ y O ₂ , llevada a cabo en 2 etapas.
	Grupo de enzimas catalasa, glutatión peroxidasa (GPx) y peroxirredoxina (Prx): ➤ Catalasa en peroxisomas y que catalizan la reacción de dismutación siguiente: Baja afinidad y muy elevada eficiencia catalítica ^{71, 76} . ➤ La glutatión-peroxidasa (GPx) , considerada la peroxidasa más importante por tener una elevada especificidad por el sustrato y una mayor afinidad por H ₂ O ₂ que la catalasa. Utiliza un residuo de cisteína para reducir peróxidos como H ₂ O ₂ . 2 tipos: ➤ GPx clásicas (cGPx). ➤ PHGPx: específica de peróxidos de la membrana lipídica. ➤ Las peroxirredoxinas (Prx) , muy abundantes aunque su eficiencia catalítica es muy inferior que la de las catalasas ⁷⁶ .	Disminuir las concentraciones de H ₂ O ₂ $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ GSH=glutatión reducido; GSSG = glutatión oxidado Implicada en la reparación de los lípidos de membrana peroxidados ^{71, 76} .
	Glutation-S-transferasas (GSTs) ⁷⁶ , dos tipos: • GSTs solubles o citosólicas. • GSTs asociadas a la membrana del retículo endoplasmático.	Detoxificación de muchos xenobióticos*. Intervienen en la reacción entre el glutatión y xenobiótico electrófilo, para generar compuestos menos

reactivos y más solubles.

Glutathion (GSH, g-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina), es un tripeptido que contiene un grupo tiol (-SH), Alta concentración intracelular (5-10 mM). Se encuentra principalmente en su estado reducido (GSH). Sólo un 1% del total, se encuentra oxidado (GSSG). La forma reducida se genera al formarse un puente disulfuro entre los grupos tioles de los residuos de cisterna de 2 moléculas de GSH. La oxidación se revierte gracias a la actividad de la enzima *glutathion reductasa*. Un ligero desplazamiento del equilibrio hacia la forma oxidada afecta drásticamente al estado redox de la célula, debido a su participación en multitud de equilibrios óxido/reducción acoplados. Un ejemplo, resulta crítico para la regulación de algunos factores de transcripción, cuya actividad depende del estado redox en el que se encuentren^{70, 76}.

- Principal sistema no-enzimático implicado en la defensa celular antioxidante.
- Eliminación de peróxidos.
- Mantener reducidos los grupos tioles (R-SH) de muchas proteínas.
- Participa de forma indirecta en la eliminación de peróxidos, al actuar como cofactor de (GPx) y como agente reductor de la enzima glutarredoxina (Grx).
- También puede conjugarse con sustratos electrofílicos, formando compuestos que generalmente son menos reactivos y más solubles.

Otros sistemas enzimáticos con actividad antioxidante⁷²:

➤ **Sistema glutarredoxina (Grx).**

Reduce puentes disulfuro entre proteína y glutathion.

➤ **Sistema tioredoxina. tioredoxinareductasa (TrxR).**

El sistema de la tioredoxina reduce directamente puentes disulfuro de ciertas proteínas y, de forma indirecta, está implicado en la detoxificación de peróxidos sirviendo como dador de electrones para enzimas como peroxirredoxinas (Prx).

EXÓGENOS

➤ **Vitamina E o alfa-tocoferol:** Actúa en las membranas biológicas. Considerada el protector más importante de las moléculas lipídicas.

Neutraliza al radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber-Weiss, oxígeno singlete, peróxidos, y neutraliza y captura anión superóxido.

➤ **Vitamina C o ácido ascórbico.**

Agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical OH[•] y al anión superóxido O₂⁻.

➤ **Beta-carotenos:**

Neutralizan el oxígeno singlete. Es necesaria la incorporación al organismo de ciertos

oligoelementos como el cobre, hierro, cinc, selenio y manganeso, pues forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes⁷⁶.

**Los xenobióticos (del griego xeno ('extraño') y bio ('vida'), son compuestos que en la naturaleza son poco frecuente o inexistentes pues son compuestos de síntesis) penetran en el organismo continuamente a través de la piel, sangre o pulmones y pudiendo ocasionar trastornos a corto y/o a largo plazo.*

Hay estudios que han demostrado que, en células de mamífero, los oxidantes están implicados en vías de señalización relacionados con procesos como tumores o envejecimiento⁷⁶.

El estado rédox de las células o de los tejidos es una realidad compleja y no puede ser medido con un único parámetro. No hay métodos estandarizados de medición y ninguno de los biomarcadores de estrés oxidativo consiguen, de manera aislada, una valoración precisa del estado. Se han utilizado una gran diversidad de métodos de aproximación. Estas determinaciones varían en función de diversos factores como el ritmo circadiano, el tiempo, la temperatura, distintos órganos y condiciones de procesamiento⁶⁹.

Tabla 7. Métodos de aproximación para medir estrés oxidativo

BIOMOLÉCULAS	MÉTODOS
Lípidos	Quimioluminiscencia
	MDA(malondialdehído)
	Dienos conjugados
	Peróxidos
	Pentano, etano
Proteínas	Compuestos carbonilos
	Grupos sulfhidrilos
	Fragmentación de proteínas
	Actividad de enzimas
ADN	Grupo aminos libres
	Base modificada

Ej. 1.- El NO es una molécula lipofílica y de vida media muy corta que es sintetizado en epitelio pulmonar. Está relacionado con procesos inflamatorios de diferentes patologías pulmonares. En los últimos años la determinación de NO en el condensado de aire exhalado ha permitido la cuantificación indirecta de la inflamación en patologías como el asma^{85, 86}.

Ej. 2.- La peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, produce aldehídos e hidrocarburos alifáticos de cadena sencilla (alcanos principalmente) (figura 8), compuestos muy volátiles, pueden ser fácilmente estudiados mediante el aire exhalado. La presencia de hidrocarburos ramificados en el aire exhalado no proviene de la peroxidación lipídica pues no existen ningún ácido graso poli insaturado ramificado. Ej. Isopreno (2-metil-1,3-butadieno) muy presente en el aire exhalado tiene que ver con el metabolismo del colesterol pero no de la peroxidación lipídica⁷⁷.

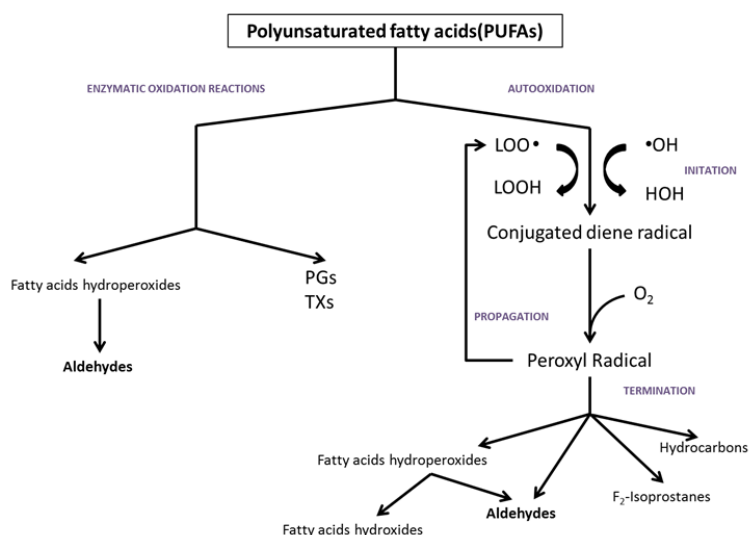


Figura 8. Esquema de peroxidación lipídica. Tomado de M. Kinter. 1995.⁸⁷

1.11. Análisis del aire exhalado. Determinación de compuestos orgánicos volátiles (VOC)

En la determinación de los VOC, es necesario diferenciar entre el *aire exhalado mezclado* y el *aire exhalado final*. El primero de ellos, es obtenido a través del proceso normal de la respiración. Éste constituye una mezcla entre la porción de aire alveolar y el aire procedente del volumen muerto del sistema respiratorio. El *aire exhalado final* es el que se obtiene al final de una exhalación profunda (próxima a CRF) y que refleja la fracción alveolar. Esta fracción de aire será la de estudio.

La composición del aire que se exhala con la respiración, refleja las alteraciones que tienen lugar en el metabolismo. Sin duda, una de las aplicaciones más interesantes de del análisis del aire exhalado podría ser su utilización como herramienta complementaria para el diagnóstico precoz de CP, pero todavía difícil de aplicar ante la falta de una estandarización en la metodología de la recogida de muestra y el conocimiento de qué compuestos parecen ser los que presentan mayor poder discriminatorio para pacientes con factores de riesgo.

Ya en el año 1971, Pauling *et al.*⁸⁸ identificaron más de 250 compuestos presentes en el aire exhalado de voluntarios, y a partir de esa fecha muchos han sido los estudios que han relacionado estas sustancias con diferentes enfermedades. En 1985, Gordon *et al.*⁸⁹ en un primer estudio con 12 pacientes con CP y 17 controles fumadores, analizaron el aire exhalado de todos ellos. El diagnóstico de CP se realizó mediante broncoscopia o biopsia de la lesión pulmonar. Las muestras de aire se recogieron antes de comenzar el

tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia mediante un sistema especialmente diseñado para la recolección de aire (figura 9) y se analizaron mediante la técnica de TD/GC/MS.

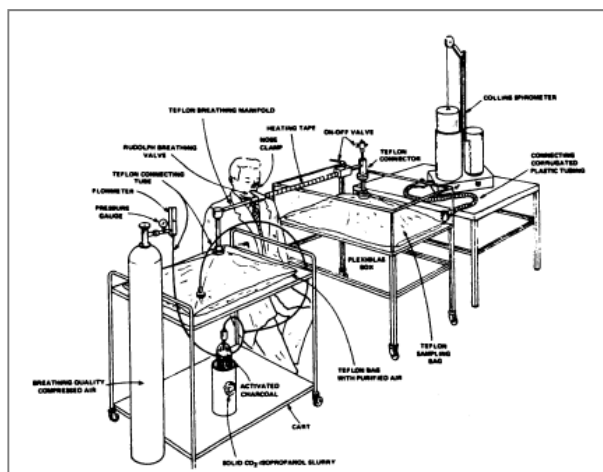


Figura 9. Sistema de recolección de aire exhalado. Tomado de Gordon *et al*⁸⁹.

De los cromatogramas obtenidos, seleccionaron 22 picos que fueron identificados mediante su tiempo de retención y espectro de masas, que marcaban diferencias entre ambas poblaciones. De estos 22, sólo 7 eran necesarios para discriminar entre los dos grupos. Su modelo demostró con una exactitud del 93% la diferenciación de los dos grupos. En ningún caso los espectros de masas de los compuestos seleccionados fueron comparados con una librería espectral para su identificación inequívoca.

Tres años más tarde, otros dos grupos⁹⁰ confirmaron sus resultados, pero con un tamaño de muestra relativamente pequeño. O'Neil *et al.*⁹¹ pertenecientes al mismo grupo de investigación de Gordon, consiguieron identificar, mediante un laborioso algoritmo de análisis de espectros de masas, diversos compuestos, mayoritariamente hidrocarburos

(alcanos, dienos y arenos principalmente) y compuestos que contenían átomos de oxígeno, azufre, nitrógeno, o algún halógeno.

De los 386 compuestos detectados, sólo 28 aparecían con mayor frecuencia en pacientes con CP, y de ellos, sólo 9 eran potencialmente marcadores, el resto eran de origen ambiental (tabla 8). Además es relevante que ninguno de los compuestos contenía ni azufre ni nitrógeno.

Tabla 8. Lista de compuestos presentes en aire exhalado de pacientes con cáncer de pulmón. Modificado de O'Neil et al.⁹¹. En el recuadro quedan señalados los potenciales marcadores.

C	H	O	Cl	F	Rt(s)	FÓRMULA	COMPUESTO
6	14				486	C ₆ H ₁₄	Hexano
6	14				470	C ₆ H ₁₄	n-metilpentano
10	22				856	C ₁₀ H ₂₂	n-trimetilheptano
5	8				500	C ₅ H ₈	Isopreno
6	6				713	C ₆ H ₆	Benceno
7	8				814	C ₇ H ₈	Tolueno
8	10				900	C ₈ H ₁₀	Etilbenceno
9	12				1001	C ₉ H ₁₂	Etil,metilbenceno
9	12				1019	C ₉ H ₁₂	Trimetilbenceno
9	12				1056	C ₉ H ₁₂	Alquilbenceno
9	12				1037	C ₉ H ₁₂	Alquilbenceno
8	8				1028	C ₈ H ₈	Estireno
10	8				1500	C ₁₀ H ₈	Naftaleno
11	10				1555	C ₁₁ H ₁₀	Metilnaftaleno
3	4				646	C ₃ H ₄	Propenal
3	6	1			628	C ₃ H ₆ O	Acetona
4	8	1			681	C ₄ H ₈ O	2-butanona
6	6	1			1600	C ₆ H ₆ O	Fenol
7	6	1			1300	C ₇ H ₆ O	Benzaldehído
8	8	1			1413	C ₈ H ₈ O	Acetofenona
9	18	1			1154	C ₉ H ₁₈ O	Nonanal
5	8	2			765	C ₅ H ₈ O ₂	Propanoato de etilo
5	8	2			776	C ₅ H ₈ O ₂	Isobutenoato de metilo
1	2		2		700	CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
6	4		2		1200	C ₆ H ₄ Cl ₂	Diclobenceno
2	1		3		766	C ₂ HCl ₃	Tricloroetano
2	1		3	1	474	C ₂ HCl ₃ F	Triclorofluormetano
2			4		800	C ₂ Cl ₄	Tetracloroetileno

En 1994 M Phillips *et al*⁹² publican un trabajo donde tratan de discriminar entre compuestos exógenos y los producidos por el metabolismo, dado que estudios anteriores

no tienen en cuenta esta cuestión. Analizan el aire exhalado de 20 voluntarios sanos y el aire ambiental de la sala donde se realiza la prueba. Las muestras son analizadas mediante TD/GC y espectroscopia de masa de trampa iónica. Las concentraciones para cada compuesto se calculan mediante el área bajo la curva de los picos cromatográficos de los 24 compuestos más abundantes presentes tanto en el aire exhalado como en el del aire de la sala. Definieron “gradiente alveolar” para cada compuesto como la resta de las concentraciones del aire exhalado menos las del aire ambiental (figura 10). Si la diferencia era positiva, el compuesto posiblemente era de origen endógeno, mientras que si era negativo, su origen probablemente fuera exógeno.

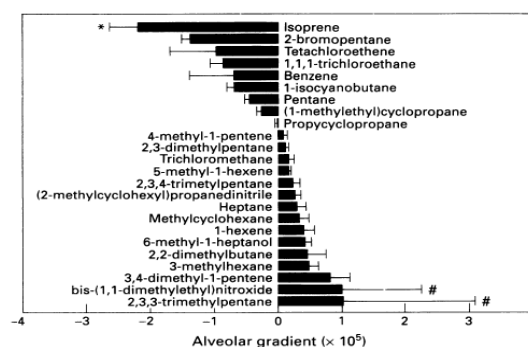


Figura 10. Gradientes de los VOC más abundantes en aire exhalado. Tomado de Phillips *et al.* 1994.⁹²

En este trabajo no se tuvo en cuenta la dieta de los participantes y probablemente alguno de los compuestos clasificados como endógenos pueda tener un origen externo como la comida o el agua. Igualmente sucede con los supuestos de origen endógeno que han podido ser excretados al ambiente por otras vías que no sea la respiratoria (hepática o renal). En cualquier caso, aunque no se explicaba cuál era la vía metabólica de formación de los compuestos; este fue un primer paso para la discriminación entre compuestos endógenos y exógenos.

En 1997 M Phillips *et al.*⁹³ describen un dispositivo de diseño propio para la recogida del aire alveolar (figura 11), eliminando en lo posible, los contaminantes procedentes del ambiente y del espacio muerto anatómico. Mediante este sistema en una muestra de 10 litros de aire alveolar y tras el análisis por desorción térmica y GC/MS identificaron más de 1200 VOC. Uno de los problemas que presentaba este dispositivo era la existencia de muchos compuestos que se sabían presentes en el aire exhalado y que no se podían determinar mediante este sistema. Los autores lo referían a que en determinadas etapas de la purificación del aire antes de su análisis, determinados compuestos se perdían.

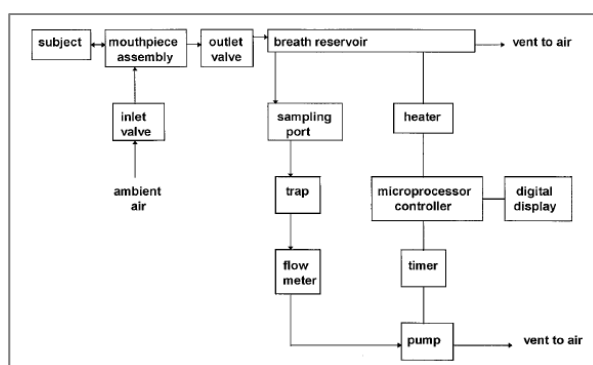


Figura 11. Esquema del aparato diseñado por el grupo de M Phillips para la recolección del aire exhalado. 1997⁹³

Este mismo grupo ha realizado diversos estudios de los que destacamos principalmente dos por los resultados obtenidos, uno publicado en 1999 en Lancet⁶⁶ y otro en 2003 en Chest⁶⁷. En el primero, se analizaba el aire exhalado de 60 pacientes con CP (diagnosticados histológicamente) y de 50 voluntarios sanos. Siguiendo la misma metodología descrita en publicaciones previas, construyen un modelo matemático con 22 VOC, principalmente hidrocarburos (alcanos ramificados e hidrocarburos aromáticos),

incluyendo también un derivado halogenado y 2 aldehídos (tabla 9). Este modelo era capaz de discriminar entre pacientes con y sin CP con una sensibilidad del 100% y especificidad del 81% para tumores en estadio I; al aumentar el estadio del tumor la especificidad y sensibilidad disminuían al 71.7% y 66.7% respectivamente. Aunque muchos de los compuestos descritos coincidían con los citados por O'Neil *et al.*⁹¹, eran incapaces de describir las rutas metabólicas de formación de casi todos ellos.

Tabla 9. Modelo de 22 VOC exhalados para CP. Phillips et al. Lancet 1999⁶⁶

Estireno	metilciclopentano	3-metiloctano	Hexanal
2,2,4,6,6-pentametilheptano	1-metil, 2-pentilciclopropano	1-hexeno	Heptanal
2-metilheptano	Triclorofluorometano	3-metilnonano	Ciclohexano
Decano	Benceno	1-hepteno	1-metiletilenbenceno
Propil-benceno	1,2,4-trimetilbenceno	1,4- dimetilbenceno	
Undecano	Isopreno	2,4-dimetilheptano	

En el estudio publicado en Chest⁶⁷, se analiza el aire exhalado de 219 personas, divididas en 5 grupos – 67 con CP primario, 15 con CP metastásico; 5 CP indeterminado (sin llegar a establecer con certeza si el origen era primario de pulmón o metastásico); 91 con RX de tórax anormal pero con broncoscopia negativa para CP y un grupo control de 41 personas no fumadores, fumadores y exfumadores, sin evidencia de EPOC. Del total de compuestos determinados, el modelo construido con 9 VOC (todos ellos alcanos) mostraba una sensibilidad del 89% y una especificidad del 83% (tabla 10).

Tabla 10. Modelo de 9 VOC para CP. Phillips *et al.* Chest. 2003⁶⁷

Butano*	4metiloctano
Pentano	5metildecano
Heptano	3-metiltridecano
2metilhexano	7metiltridecano
3metilhexano	

*mejor discriminante

Además el modelo predictivo no se ve afectado por el tabaquismo, ni por el estadiaje TNM, ni por la histología del tumor. El “gradiente alveolar” de estos VOC era positivo para el grupo control y negativo para el grupo CP. Para explicar este resultado se basaron en la hipótesis de que su concentración estaba disminuida (por ello el “gradiente alveolar” era negativo) porque el metabolismo de estos compuestos estaba aumentado tras activarse determinados polimorfismos del citocromo P450 (CYP) que están relacionados con el cáncer de pulmón. La inducción de CYP no sólo ocurre en el tejido fino del tumor, también ocurre en otras regiones del cuerpo, explicando así porqué el perfil de VOC es similar en todas las etapas del cáncer de pulmón y tampoco varía después de la resección del tumor. Se suman así dos factores de riesgo para el cáncer de pulmón, determinados polimorfismos del CYP, y el riesgo de inhalar los compuestos cancerígenos presentes en el ambiente incluido el humo de tabaco.

Estos estudios de Phillips^{66,67} fueron posteriormente, criticados por varios motivos como haber seleccionado grupos de estudio mezclados (NICP e ICP), no diferenciar entre la existencia o no de metástasis, no incluir un grupo de pacientes con EPOC y no estudiar

la influencia de la EPOC como factor de confusión. Además, la fórmula empleada para calcular los gradientes alveolares no explicaba la complejidad de la absorción pulmonar.

En 2005 Poli *et al.*⁹⁴ publicaron un trabajo donde se describe un nuevo método de recogida de muestra y de análisis, cuyos resultados contradicen a los de Phillips. El estudio transversal constaba de 36 pacientes con NICP en estadio temprano (T1-T2) y con criterios quirúrgicos, y se recogía la muestra antes y después de la cirugía. Introdujo en el estudio 25 pacientes con EPOC leve o moderado según escala GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) y un grupo de pacientes asintomáticos compuesto por 35 fumadores y 50 no fumadores, sin asma y con espirometría dentro de la normalidad. Además analizó 20 muestras de aire ambiental de la habitación donde se tomaron las muestras. El modelo predictivo propuesto contaba con 13 VOC, todos ellos hidrocarburos alifáticos y aromáticos (tabla 11), de ellos, 10 de los compuestos tenían concentraciones superiores en pacientes con CP frente al resto de grupos. Para el grupo EPOC, 9 de los 13 VOC propuestos presentaban concentraciones aumentados frente al grupo control. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los VOC de los pacientes con CP antes y después de la cirugía. Este modelo presentaba una sensibilidad del 72% y una especificidad del 94%.

Tabla 11. Modelo de VOC para CP. Poli *et al.* Repir Res. 2005⁹⁴

Isopreno	2,2,4,6,6-pentametilheptano
Pentano	Benceno
Heptano	Tolueno
Octano	Etilbenceno
Decano	1,2,4-trimetilbenceno
2-metilpentano	

Clasificó los compuestos en 3 tipos dependiendo del origen de estos. Los del grupo 1 eran endógenos, aunque también se encuentran en el ambiente. El grupo 2 son exógenos y los del grupo 3 son heterogéneos y de difícil interpretación.

Además, demostraron que las concentraciones de isopreno y de decano, estaban disminuidas después de la resección del tumor. De acuerdo con la hipótesis planteada por los autores, existen VOC exhalados que son producidos por las células tumorales, lo que explica que sus concentraciones se vean disminuidas después de la resección. Esta teoría fue apoyada por otros estudios realizados mediante cultivo *in vitro* de células de tumores no microcíticos de pulmón⁹⁵.

Del estudio de Poli cabe destacar varios aspectos importantes. El primero de ellos es la recogida de la muestra mediante cámaras BioVOC® (figura12), dispositivo de teflón que no ofrece resistencia alguna, de fácil manejo y que permite analizar siempre un volumen fijo. Al realizar la toma mediante una espiración forzada, se elimina en la medida de lo posible la mayor parte del aire que proviene del espacio muerto anatómico. Y otro de los aspectos importantes es la utilización de fibras de micro-extracción en fase sólida (SPME), que han sido utilizadas posteriormente por gran número de autores. Presentan grandes ventajas aunque también tienen sus inconvenientes.



Figura 12. BioVOC breath Sampler. Markes Int.

Los estudios de Poli *et al.*⁹⁴ o Phillips *et al.*^{66,67}, comprobaron que la combinación de diferentes VOC sólo era función de la actividad celular y no del estadio de la enfermedad ni del consumo activo de tabaco.

Estos estudios, tanto los de Phillips como los de Poli, fueron cuestionados posteriormente, al no poder establecer el origen metabólico de los compuestos propuestos como marcadores y por tener tamaños muestrales reducidos.

A finales de 2007, Phillips *et al.*⁹⁶, describen una nueva combinación de 16 VOC muy diferentes a los estudiados hasta el momento. El modelo propuesto mediante un análisis multivariante con lógica difusa predijo CP primario con una sensibilidad del 85% y una especificidad del 80%, la precisión de la prueba era comparable a la del TC de tórax y no se vio afectada ni por el estadio TNM del tumor ni por el tabaquismo actual o anterior. Los valores de los VOC incluidos en el modelo estaban disminuidos en pacientes con cáncer de pulmón frente a un grupo control con TC de tórax normal. La hipótesis (figura 13)⁹⁷ se ve apoyada por el hecho de que los VOC pueden ser alterados antes de la aparición de lesiones macroscópicas porque se inducen las formas del citocromo CYP de alto riesgo, que preceden a la aparición de una neoplasia. La inducción de CYP en los genotipos de alto riesgo, hace que aumente el riesgo de sufrir un cáncer de pulmón y se acelere el catabolismo de los VOC reduciendo su abundancia en el aire exhalado.

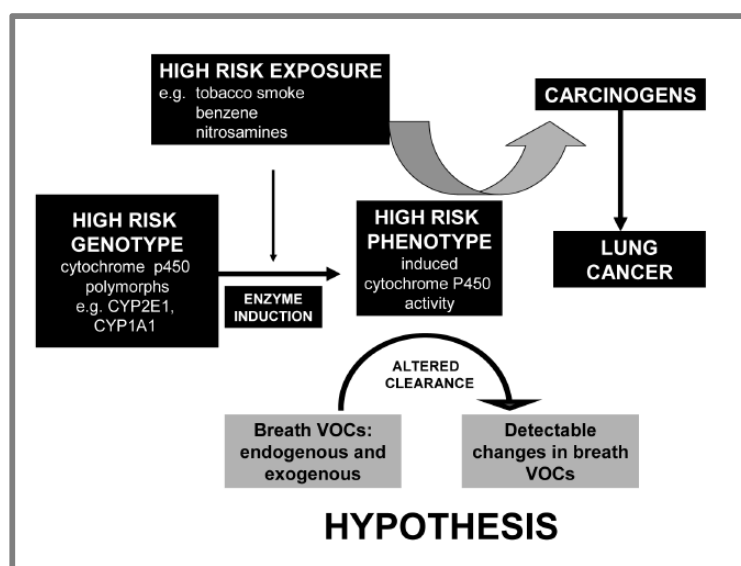


Figura 13. Hipótesis de trabajo sobre la producción de VOC y metabolismo de los VOC inhalados y su relación con CP. Tomado de Phillips *et al.* 2008⁹⁷.

En 2007 Buszewski *et al.*⁹⁸ y posteriormente Horváth *et al.*⁹⁹ en 2009, publican dos revisiones de los estudios de biomarcadores en aire para CP más importantes escritos hasta la fecha, siendo la mayor parte de ellos los correspondientes al grupo de Phillips *et al.*^{66,67}. De ellos se obtienen conclusiones muy importantes:

- a) Los compuestos descritos con más frecuencia, que son acetona, isopreno e hidrocarburos lineales, ramificados y aromáticos. Aunque explica los mecanismos metabólicos de formación de parte de estos compuestos, bien es verdad que para los 3 primeros las causas de formación son tan diversas que su valoración como marcadores pueden devenir en factores de confusión. Para los hidrocarburos ramificados no existe, hasta el momento, ninguna explicación de cuáles son sus mecanismos de formación no pudiendo justificarlo por la teoría de cambios

inducidos por estrés oxidativo. Los compuestos hidrocarburos aromáticos son contaminantes ambientales.

- b) Los modelos planteados no se ven afectados ni por el tabaquismo (que pudiera considerarse como un factor de confusión al incrementar el estrés oxidativo), ni por el estadio del tumor, lo que permitiría, en un futuro, tras mucha investigación, la aplicación de los VOC dentro del campo del diagnóstico precoz.

En 2012 van de Kant *et al.*¹⁰⁰ realizan otra revisión sistemática de los artículos publicados hasta esta fecha sobre los VOC detectados en aire exhalado o mediante el empleo de nariz electrónica para diferentes patologías respiratorias. La mayor parte de los estudios recogidos de VOC en esta revisión corresponden a cáncer de pulmón. En la tabla 12 se recogen únicamente los estudios de VOC para CP determinados mediante cromatografía de gases.

Tabla 12. Principales estudios publicados de CP y VOC determinados por GC/MS o GC/FID. Modificado de Van de Kant 2012¹⁰⁰

Autor Año	Grupos de estudio	Nº Pacientes	VOC		Ref.
Buszewski (2012)	CP	29	Acetona	2-Pentanona	101
	Control	44	Benceno	Propanal	
	Sano		Butanal	1-Propanol	
			2-Butanona	2-Propanol	
			Acetato de etilo	2-Propenal	
			Etilbenceno		
Rudnicka (2011)	CP	23	Propano	Isopropílico	102
	Control	30	2-Propenal	Etilbenceno	
	Sano		Disulfuro de Carbono	Estireno	
Ulanowska (2011)	CP	137	Etanol	1-Propanol	103
	Control	143	Butano	2-Pentanona	
	Sano		Acetona	Furano	
			Sulfuro de dimetilo	o-Xileno	
			Isopreno	Etilbenceno	
			Propanal		
Fuchs (2010)	CP	12	Pentanal	Nonanal	104
	Control NF	12	Hexanal		

	Control F	12	Octanal		
Kischkel (2010)	CP	31	Sulfuro de dimetilo	Butano	105
	Control F	31	Dimetil formamida	Butanal	
	Control NF	31			
Poli (2010)	CP	40	Propanal	Heptanal	106
	Control	38	Butanal	Octanal	
	Sano		Pentanal	Nonanal	
			Hexanal		
Song (2010)	CP	43	1 – butanol		107
	Control sano	41	3-hidroxi-2-butanona		
Ligor (2009)	CP	65	1-propanol	2-metilpentano	108
	Control sano	31	2-butanona	3-metilpentano	
			3-butin2-ol	n-pentano	
Gaspar (2009)	CP	18	Benzaldehído	n-hexano	109
	Control sano	10	Set de VOCs		
Bajtarevic (2009)	CP	285	Isopreno		110
	Control sano	472	Acetona		
Crohns (2009)	CP	11	Metanol		111
	Control sano	30	Pentano		
Peng (2009)	CP	40	Set 42 VOC		112
	Control sano	56			
Poli (2008)	CP*	36	Isopreno	Xilenos	113
	Control sano	50	Pentano	1,2,4-trimetilbenceno	
			2-Metilpentano	Toluene	
			2,2,4,6,6-Pentametilheptano	Etilbenceno	
Phillips (2008 y 2007)	CP	193			96
	Control F	211			97
Poli (2005)	CP	36	2-Metilpentano	Tolueno	94
	EPOC	25	Pentano	Benceno	
	Control F	35	Decano	Etilbenceno	
	Control NF	50	Octano	Xylenos	
			2,2,4,6,6-Pentametilheptano	1,2,4-trimetilbenceno	
Phillips (2003)	CP	87	Butano	4-metiloctano	67
	No CP*	81	Pentano	5-metildecano	
	Control	41	2-metilhexano	3-metiltridecano	
	Sano		3-metilhexano	7-metiltridecano	
			Heptano		
Phillips (1999)	CP	60	Isopreno	1-metil,2-metilciclopentano	66
	no CP*	48	Estireno	pentilciclopropano	
			2-Metilheptano	Triclorofluorometano	
			Pentano	1,2,4-trimetilbenceno	
			Decano	1-hexeno	
			undecano	3-metilnonano	
			3-metiloctano	1-hepteno	
			Propilbenceno	1,4-dimetilbenceno	
			Benceno	2,4-dimetilheptano	
			hexanal	Ciclohexano	

			2,2,4,6,6-Pentametilheptano	Heptanal 1-metilvinilbenceno	
Preti (1988)	CP	10	o-Toluidina		90
	Control sano	16			
Gordon (1985)	CP	12	22 VOC		89
	Control sano	9			

*(Rx tórax anormal)

En relación a los VOC determinados, de los 16 estudios seleccionados para CP, se observa cómo a lo largo del tiempo la naturaleza de los compuestos a determinar va cambiando, pasando de estudios iniciales con compuestos de naturaleza hidrocarburos a estudios donde principalmente se determinan compuestos oxigenados, aunque sigan incluyendo VOC de naturaleza aromática.

La carencia de un muestreo estandarizado¹¹⁴, los diferentes algoritmos estadísticos aplicados, el número y los VOC seleccionados parecen ser las razones principales de la diversidad de resultados obtenidos.

De todos ellos, destacamos los estudios realizados por Ligor H *et al.*¹⁰⁸ que describen 8 posibles marcadores de CP (1-propanol, 2-butanona, 3-buten-2-ol, benzaldehído, 2-metil-pentano, 3-metil-pentano, n-pentano y n-hexano). Por su parte, Song G *et al.*¹⁰⁷, en un estudio publicado en 2010, apuestan por la utilidad de 1-butanol y 3-hidroxi-2-butanona, como marcadores de CP pues se encuentran significativamente más elevados en pacientes con NICP frente a una población control. Los últimos estudios publicados por Poli *et al.*¹⁰⁶ y Fuch *et al.*¹⁰⁴, afirman que los **aldehídos, hexanal, heptanal, octanal y nonanal** muestran diferencias significativas entre los diversos grupos de estudio.

Estos compuestos son los metabolitos finales en las reacciones de peroxidación de los ácidos grasos $\omega 3$ y $\omega 6$ y su presencia es muy superior en pacientes con CP frente a grupos control. Hay que tener en cuenta que estos estudios cuentan con un número muy reducido de casos, lo que invita a continuar investigando en esta línea.

El estudio del aire exhalado está teniendo un gran auge no sólo para el estudio de biomarcadores en CP, sino también en otras patologías respiratorias como EPOC, asma y fibrosis. Y no sólo en patologías respiratorias, también se están estudiando en población sana, como muestran los estudios de Jareño *et al.*¹¹⁵ y Huang *et al.*¹¹⁶. También se están estudiando posibles biomarcadores de otros sistemas, por ejemplo, e cáncer de mama según un estudio publicado en 2014¹¹⁷. En él se determinan aldehídos alifáticos como marcadores de cáncer. El modelo propuesto para hexanal, heptanal, octanal y nonanal alcanza una sensibilidad del 92% y una especificidad del 96% para el diagnóstico temprano de la enfermedad.

1.11.1. Estudios de VOC en EPOC

Los estudios de VOC en pacientes con EPOC requieren un trato especial. Como es sabido, esta enfermedad se caracteriza por una limitación crónica al flujo aéreo y una respuesta inflamatoria crónica exagerada de las vías aéreas y de los pulmones frente a partículas nocivas o gases, como el humo de tabaco. Al ser una enfermedad estrechamente ligada al tabaco, incrementa el riesgo de desarrollar CP. El poder caracterizar los VOC en este grupo parece ser necesario para poder estudiar correctamente al grupo CP.

Son pocos los estudios de VOC y EPOC publicados hasta la fecha. En 2003 Corradi *et al.*¹¹⁸, pertenecientes al grupo de Poli, analizan aldehídos en el condensado de aire exhalado de pacientes con EPOC frente a un grupo control. Si bien, la técnica instrumental es diferente al tratarse de cromatografía de líquidos, concluye que sólo el malondialdehído, consigue diferenciar pacientes con EPOC frente a controles.

En 2010 Van Berkel *et al.*¹¹⁹ construyen un modelo con 13 VOC (tabla 13) que permite clasificar población sana y pacientes con EPOC, alcanzando una sensibilidad del 98% y especificidad del 88%, aumentando a una sensibilidad del 100% y especificidad del 81% cuando sólo se consideraban 6 de los 13 VOC propuestos (marcados con asterisco).

COMPUESTO	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	
Isopreno*	98%	88%	100%	81%	
C16 hidrocarburo*					
4,7-Dimetill-undecano*					
2,6-Dimetil-heptano*					
4-Metil-octano*					
Hexadecano*					
3,7-Dimetil 1,3,6-octatrieno					
2,4,6-Trimetil-decano					
Hexanal					
Benzonitrilo					
Octadecano					
Undecano					
Terpineol					

En 2011 Fens *et al.*¹²⁰ realizan un estudio complicado donde correlacionan un patrón de VOC analizados por cromatografía y un perfil obtenido mediante nariz electrónica, con poblaciones celulares de inflamación (polimorfonucleares (PMN) y eosinófilos (EO)), y marcadores inflamatorios (proteína catiónica del eosinófilo (PCE) y la

mieloperoxidasa (MPO)) en esputo inducido, de pacientes con EPOC leve-moderado (subtipo bronquitis crónica).

Para GOLD I, los resultados que obtuvieron mostraron correlaciones de 8 VOC con EO, y 17 VOC con PMN (tabla 14), siendo uno de ellos (alquilbenceno) común a las dos poblaciones celulares. En el caso de los marcadores de inflamación PCE y MCO, ambos presentan buena asociación con los VOC (19 VOC con la PCE ($p < 0.01$) y 4 VOC con MPO ($p < 0.01$)). En cuanto a la aplicación de la nariz electrónica hallan buena correlación entre los “*breathprint*” con PCE ($r = 0.84$ y $p = 0.002$) y con MPO ($r = 0.72$, $p = 0.008$).

Tabla 14. VOC propuestos para el grupo de EPOC por Fens *et al.* 2012¹²⁰.

Retention time min	Tentative compound assignment	Chemical class	Correlation with		Correlation coefficient
			Sputum eosinophils %	Sputum neutrophils %	
4.82	Unknown			X	0.56
5.01	Pentane	Alkanes		X	0.55
5.38	Unknown			X	-0.55
5.97	Unknown		X		0.61
6.05	2-Butanone	Ketones	X		0.62
7.37	Unknown			X	-0.57
7.70	Benzene	Aromatic hydrocarbons		X	-0.59
8.34	3-Methylhexane	Methyl-branched alkanes		X	-0.59
8.80	Trichloroethylene	Chlorinated hydrocarbons		X	-0.56
10.14	Toluene	Aromatic hydrocarbons		X	-0.64
10.33	2-Methylpentane	Methyl-branched alkanes		X	-0.55
10.68	Alkylated cyclohexane*	Cyclic alkanes		X	-0.57
12.52	2-Methylheptane	Methyl-branched alkanes	X		-0.58
12.62	Styrene	Aromatic hydrocarbons		X	-0.68
12.79	Alkylated cyclohexane*	Cyclic alkanes		X	-0.55
13.76	Dimethyloctane	Methyl-branched alkanes		X	-0.57
15.01	Branched alkane*	Alkanes		X	-0.56
15.36	Alkylated benzene*	Alkyl benzenes	X	X	0.56
15.84	Branched alkane*	Alkanes		X	-0.58
16.22	Unknown		X		0.58
16.31	5-Nonanol	Alcohols	X		0.56
16.50	Dimethyl-3-octanol	Alcohols	X		0.61
17.38	Unknown		X		-0.59
18.54	Unknown			X	-0.60

X indicates a correlation. *: The exact chain length of the alkyl moieties could not be determined from the mass spectra.

Concluyen que perfiles moleculares exhalados (VOC y “*breathprint*”) están estrechamente relacionados con el tipo de células inflamatorias en el esputo y su estado de activación en la EPOC leve. Esto les sugiere que el análisis del aire exhalado puede ser de utilidad para la evaluación y seguimiento de la inflamación de las vías respiratorias en la EPOC.

Basanta *et al.*¹²¹ en 2012 publican un trabajo en pacientes con EPOC según los diferentes fenotipos. Los compuestos estudiados son aldehídos y ácidos orgánicos. Estudian 71 personas, de las cuales 39 eran EPOC y 32 controles, y construyen un modelo compuesto principalmente por aldehídos (C6, C9, C10, C11, C12 y C15) y ácido pentanoico. Al comparar el grupo EPOC con su grupo control obtienen una especificidad del 87% y una sensibilidad del 50%. Sin embargo, cuando sólo seleccionan personas fumadoras del grupo control con personas fumadoras del grupo EPOC, la sensibilidad aumentaba al 92% y la especificidad al 90%. El modelo matemático era más efectivo en personas fumadoras. El único compuesto relacionado con la medicación con tratamiento esteroideo fue el undecanal.

El estudio de Basanta para la EPOC, es el único que, hasta el momento, ha incluido un ácido carboxílico como marcador de patología.

En 2014 C Phillips *et al.*¹²² publican un estudio utilizando la misma metodología que la empleada por nosotros (recogida de muestra con BioVOC, tubos de desorción universales y TD-GC/MS). El único VOC que muestra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y EPOC es el isopreno.

Besa V *et al.*¹²³, en un estudio recientemente publicado analizan los VOC en un grupo EPOC frente un grupo de controles sanos, fumadores y no fumadores. En este estudio, seis VOC son suficientes para discriminar correctamente a pacientes del grupo EPOC en relación a controles sanos, con una precisión del 70%. Sólo encontraron 15 picos que diferenciaban a sanos fumadores frente a sanos no fumadores. En este estudio utilizan una metodología diferente (IMS) que identifica perfiles de VOC sin especificar qué compuestos están implicados. Este trabajo es un primer paso interesante pero deja todavía muchas lagunas que aclarar.

En la actualidad, dada la elevada incidencia y prevalencia del cáncer de pulmón, son muchos los estudios que pretenden identificar un marcador para el diagnóstico precoz de la enfermedad o para seleccionar grupos de pacientes que puedan ser incluidos en los programas de diagnóstico precoz de cáncer de pulmón (DPCP). El empleo de nuevas técnicas que permitan un diagnóstico en fases tempranas es, pues, fundamental para obtener mejores resultados terapéuticos. El análisis del aire exhalado es particularmente interesante en este sentido y aunque no exista una estandarización en cuanto a la metodología de recogida de muestra, los últimos resultados publicados alcanzan un resultado común en cuanto qué familia de VOC parecen ser más específicos en pacientes con CP.

HIPÓTESIS

2. HIPÓTESIS

El incremento del estrés oxidativo que tiene lugar en el seno de un tumor provoca daños estructurales en todas las macromoléculas celulares. La peroxidación lipídica genera la destrucción de los fosfolípidos de membrana, dando lugar a compuestos orgánicos volátiles (VOC) que son exhalados durante la respiración, y que pueden ser detectados en el aire exhalado. En este sentido, es probable que la presencia de estos compuestos pueda ser un marcador de cáncer y que, de la misma forma, sean considerados como herramienta complementaria para el diagnóstico precoz de la enfermedad.

Dado lo anterior, enunciamos la siguiente **HIPÓTESIS:**

Como consecuencia de la enfermedad neoplásica, podrían existir VOC específicos en pacientes con CP frente a una población sin CP.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

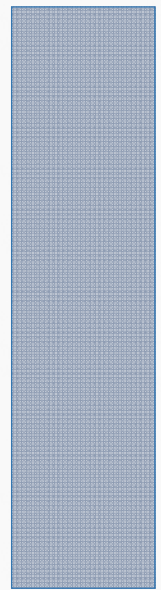
3.1 PRINCIPAL

1. Buscar diferencias significativas de los VOC en aire exhalado en una población con cáncer de pulmón frente a grupos EPOC y control.

3.2 SECUNDARIOS

1. Determinar el efecto del hábito tabáquico sobre los VOC detectados en aire exhalado en una población presuntamente sana.
2. Determinar si existen diferencias en los VOC exhalados en pacientes con diagnóstico de EPOC frente a una población presuntamente sana.

MATERIALES Y MÉTODOS



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

Los materiales utilizados para el estudio se han dividido en dos grupos, material para la toma de muestra de aire (exhalado y ambiental), y los materiales para el análisis cromatográfico.

a) Material para la toma de muestra de aire:

- BioVOC Breath Sampler (Markes Int.)
- Tubos de desorción térmica Universal / TO-17/2, rellenos de: Tenax TA + Graphitised Carbon Black + Carbonised Molecular Sieve.(Markes Int.)
- Tapones DiffLok™ (Markes Int.)

b) Material cromatográfico – desorción térmica:

- Jeringa Hamilton de 1 µl para cromatografía de gases.
- Cold trap: Unity General purpose Hydrophobic. U-T2GPH (Markes Int.)
- Columna cromatográfica empleada: DB1-30m x 0.25mm x 1µm (Agilent Tech.)

Los equipos utilizados son:

- Dispositivo CSLR™ (Calibration Solution Loading Ring) para la inyección de patrones líquidos en tubos de desorción.
- Inyector automático (Ultra TD™ multi-tube autosampler) (Markes Int.)

- Unidad de desorción térmica (TDU) Unity™ (MarkesInt.)
- Cromatógrafo de gases 7890A GC System (Agilent Tech.)
- Espectrómetro de masas cuadrupolo simple (5975C VL MSD), con fuente de ionización de impacto electrónico (Agilent Tech.)
- Válvula divisora de flujo automático (Deans-Switch), (Agilent Tech.)

Programas informáticos utilizados:

- ChemStation - vE1701E02 E.02 (Agilent Tech.)
- Data Analysis (Agilent Tech.)
- AMDIS(Agilent Tech.)
- Software de Deconvolución DRS (Agilent Tech.)
- SPSS V-15 para Windows ®

Reactivos:

En este trabajo los compuestos químicos empleados han sido los patrones cromatográficos, todos ellos de calidad para cromatografía de gases, que fueron los siguientes: ácido propanoico, 2-butanona, n-pentano, n-hexano, hexanal, 2-metilpentano, 2-metilhexano, n-heptano, heptanal, octanal, nonanal, ácido nonanoico, benceno, tolueno, estireno e isopreno de la marca Fluka®.

Como disolventes para las distintas preparaciones de patrones se emplearon metanol ultrapuro para cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) al 99.9% y acetona al 99.8% ambas de Panreac®.

4.2. Métodos

Los métodos empleados en este trabajo se han agrupado en 4 apartados:

4.2.1. Diseño del estudio y definición de los grupos

Estudio casos control, con muestreo consecutivo no probabilístico. Se seleccionaron un total de 210 personas, divididas en 3 grupos:

- **Grupo control:** Se incluyeron 89 voluntarios sanos que accedieron a participar en el estudio. Se reclutaron mediante divulgación del estudio en el Hospital Central de la Defensa "Gómez Ulla", Cuartel General del Ejército del Aire y Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Estas personas se subdividieron en tres categorías en función del consumo de tabaco, resultando ser *35 no fumadores*, *24 exfumadores* y *30 fumadores activos*.
- **Grupo EPOC:** Se incluyeron 40 pacientes con diagnóstico de EPOC en periodo de estabilidad clínica procedentes de los hospitales participantes y que acudieron a consulta de revisión.
- **Grupo CP:** Se incluyeron 81 pacientes con diagnóstico histológico de CP procedentes de los hospitales participantes. Para el TNM se aplicó la clasificación de Mountain del año 1997¹²⁴.

El periodo de inclusión de los participantes abarcó desde octubre de 2010 a diciembre de 2011.

Criterios de inclusión

Los **criterios de inclusión** para los tres grupos exigieron la aceptación personal para participar en el estudio, edad mayor de 40 años, ser no fumadores, ex fumadores, o fumadores activos, según criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS). A todos ellos se les realizó exploración clínica y complementaria, incluyendo electrocardiograma, RX de tórax, hemograma, bioquímica y curva flujo/volumen. Ningún participante presentó signos o síntomas de enfermedad.

Criterios de exclusión

Se consideraron **criterios de exclusión**, la existencia de enfermedad pulmonar o tumoral actual o previa de cualquier aparato o sistema, o la negativa a participar en el estudio. No se aplicó restricción por razón de género.

Se informó a todos los participantes del estudio de los objetivos, riesgos y beneficios, pruebas a realizar y técnicas empleadas para la realización del mismo. Se hizo entrega de un documento informativo previo a la firma del consentimiento informado (*anexo I*). Todos los datos recogidos concernientes al estudio se hallan sujetos a lo establecido en la Ley Orgánica de Protección de Datos 15/1999, de 13 de diciembre, y en la Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente y de Derecho y Obligaciones en el Manejo de la Información y Documentación Clínica, de 14 de noviembre.

El protocolo de estudio fue autorizado por el Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Central de la Defensa “Gómez Ulla” (NºR: IS-404030-S-06-000153) (*Anexo II*).

4.2.2. Toma de la muestra

La muestra de aire exhalado de cada uno de los participantes en el estudio se recogió tras permanecer una hora en reposo, sin fumar y en ayuno. Para la recogida del aire exhalado se utilizaron cámaras BioVOC® (Markes Int.)TM (figura 14) mediante una maniobra de espiración forzada. El aire correspondiente al espacio muerto anatómico pasa a través del BioVOC, quedando recogido en la cámara la fracción que corresponde al final de la capacidad vital forzada, siendo lo más representativo posible del aire alveolar. Esta maniobra se repitió tres veces para la preconcentración de los compuestos. A continuación se recogió una muestra de aire ambiental de la sala en donde permaneció la persona estudiada, lo que permitiría comparar los niveles de VOC del aire ambiente y del exhalado.

Tras cada maniobra, el aire recogido se traspasó a un tubo de desorción térmica (figura 15) capaz de adsorber compuestos desde C2 hasta C20. El tubo quedó sellado con tapones DiffLoks para su posterior análisis. Todas las muestras se analizaron en un plazo inferior a 24 h desde su recogida.



Figura 14. BioVOC® Breath Sampler. (Markes Int.™)



Figura 15. Tubo de desorción TO-17/2 y Dif Locks Caps (Markes Int.™)

4.2.3. Selección de compuestos a estudiar

Para delimitar la búsqueda de compuestos de entre los más de mil descritos en la bibliografía, en una primera etapa, se creó en AMDIS una base de datos compuesta por 42 compuestos químicos volátiles relacionados con la oxidación de moléculas que van desde hidrocarburos, aldehídos y cetonas hasta ácidos carboxílicos, además de compuestos de naturaleza exógena como son los hidrocarburos aromáticos. De esta manera se ha limitado el campo de búsqueda a unas decenas de compuestos y no a las centenas que están descritas. La relación de compuestos incluidos se muestra en la tabla 15.

Tras aplicar el algoritmo de identificación de AMDIS – DRS se obtuvieron una serie de compuestos que aparecen con relativa frecuencia en el aire exhalado y en el aire ambiental. Esta selección de compuestos, que inicialmente se identificaron por espectro de masas, posteriormente se confirmaron mediante el empleo del patrón cromatográfico puro, que tras ser analizado bajo las mismas condiciones debería de tener concordancia en el tiempo de aparición del compuesto (*tiempo de retención: Rt*) y en su espectro de

masas. Se han dado como positivos todos aquellos compuestos en los que el tiempo de retención coincidían y la pureza espectral superaba un score del 75%.

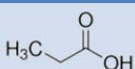
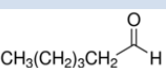

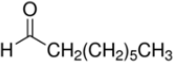
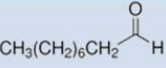
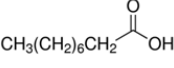
Tabla 15. Selección de compuestos

Butano	2-metilpentano	Isopreno	Hexanal
Pentano	3-metilpentano	Limoneno	Heptanal
Hexano	2-metilhexano	Benceno	Octanal
Heptano	3-metilhexano	Tolueno	Nonanal
Octano	4-metiloctano	Estireno	Ácido Acético
Nonano	2-metildecano	p-xileno	Ácido Propanoico
Decano	5-metildecano	o-xileno	Ácido Hexanoico
Undecano	3-metiltridecano	Fenol	Ácido Heptanoico
Dodecano	7-metiltridecano	Benzaldehído	Ácido Octanoico
Tridecano	Ciclohexano	Acetona	Ácido Nonanoico
Tetradecano	Isoctano	2-butanona	

Para la selección final de compuestos a estudiar, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

1. Revisiones bibliográficas que facilitaron descartar VOC no utilizables como marcadores de CP ^{66,67,94}.
2. Desconocimiento del origen metabólico de muchos VOC presentes en el aire exhalado, y que también fueron descartados.
3. Se incluyeron VOC cuyo origen metabólico estaba descrito previamente como compuestos resultantes de peroxidación lipídica.
4. La experiencia acumulada por nuestro grupo en cuanto a la frecuencia de aparición de determinados VOC.

Finalmente, centramos el estudio en aldehídos lineales y ácidos carboxílicos lineales, con un número de átomos de carbono comprendido entre 3 y 9. Los VOC a los que se ha dado preferencia para el estudio son los siguientes (tabla 16):

Tabla 16. Nombre y fórmula química de los VOC seleccionados para el estudio	
Ácido Propanoico	
Hexanal	
Heptanal	
Octanal	
Nonanal	
Ácido nonanoico	

4.2.4. Técnica analítica

La técnica analítica utilizada para el análisis de muestras fue la desorción térmica-cromatografía de gases y espectrometría de masas (DT-GC/MS) según las siguientes etapas:

4.2.4.1. Desorción térmica:

Es un procedimiento por el cual se extraen de la matriz adsorbente los gases contenidos en la muestra de aire exhalado. Debido a la complejidad del sistema, el

manejo de estos tubos, la preparación de patrones para la calibración, así como los procesos implicados en el análisis requieren de una descripción más detallada que se ofrece a continuación.

➤ Acondicionamiento de los tubos de desorción

Los tubos de desorción han de ser acondicionados antes de cada análisis, que consiste en la desorción de los posibles compuestos que el tubo pueda contener antes de la introducción de una muestra; para ello se han empleado las condiciones térmicas recomendadas por el fabricante. Existen dos tipos de acondicionamiento, uno previo al primer uso del tubo, más intenso, y otro para posteriores ciclos de análisis. Ambos se detallan en la tabla siguiente.

Tabla 17. Condiciones de tiempo (s) y temperatura (°C) para los acondicionamientos de los tubos

Acondicionamiento inicial		Acondicionamiento en uso	
t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)
60	100	15	100
60	200	15	200
60	300	15	300
60	335	15	335

La vida media de cada tubo, según indica el fabricante, es de aproximadamente 100 ciclos de desorción, incluyendo análisis y acondicionamientos.

➤ Desorción con fines analíticos

El proceso de desorción de los tubos con fines analíticos implica la introducción de los mismos en un sistema automático de muestreo Ultra TD™ multi-tube autosampler, acoplado al sistema de desorción térmica Unity™ Thermal desorber con una trampa fría hidrofóbica “coldtrap”(Unity General purpose Hydrophobic. U-T2GPH (Markes Int. Ltd.).

El proceso de desorción comprende 3 etapas:

- Prepurga. Consiste en limpiar el sistema con He durante 1 minuto a temperatura ambiente (figura 16).

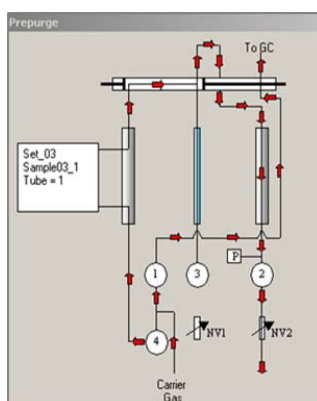


Figura 16. Prepurga. El flujo de helio recorre todo el sistema.

- Desorción térmica, el tubo es calentado a 250°C durante 10 minutos y los gases son almacenados en la *coldtrap* por condensación a 35°C, actuando como sistema de preconcentración. (figura 17).

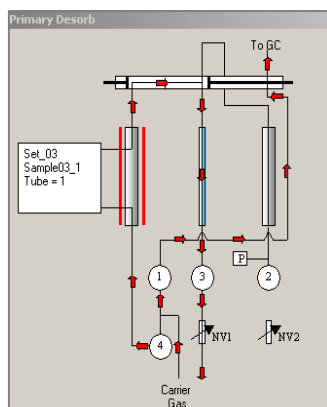


Figura 17. Calentamiento del tubo de desorción. Se indica el flujo de He, que va transportando la muestra a la *coldtrap*

- Calentamiento de la *coldtrap*. Durante 3 minutos se calienta la *coldtrap* a 250°C para que los componentes de la muestra pasen a fase gaseosa y puedan ser inyectados en la columna del cromatógrafo de gases (figura 18).

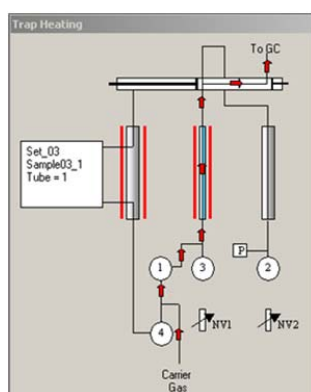


Figura 18. Calentamiento de la *coldtrap* y flujo de He hacia el GC

4.2.4.2. Separación cromatográfica

Los compuestos procedentes de la *coldtrap* son inyectados en el cromatógrafo de gases, modelo 7890 A (Agilent Tech.). Se ha empleado una columna cromatográfica DB1-30 m x 0.25 mm x 1 μ m, como fase estacionaria, y helio como gas portador (fase móvil). Al

final de la columna y antes de la entrada al detector de masas se instaló una válvula de división de flujo (Deans Switch) que permitió dividir el flujo de la muestra durante el proceso cromatográfico. Esta válvula se abre en el minuto 0.30 permaneciendo abierta hasta el minuto 4:30. Durante este periodo de tiempo se elimina la mayor parte del agua contenida en la muestra del aire exhalado, sin llegar a perder ninguno de los compuestos utilizados para la validación del método ni de los buscados en el aire exhalado.

Las rampas de temperatura empleadas se recogen en el siguiente gráfico (figura 19):

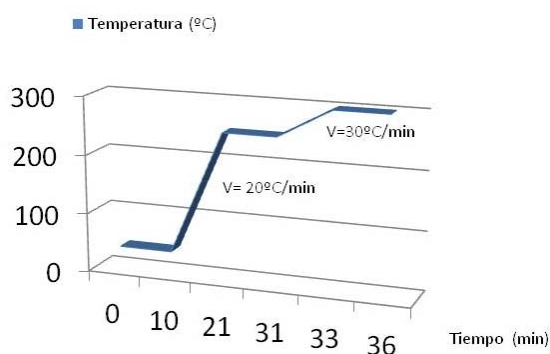


Figura 19. Método analítico de cromatografía

La cromatografía programada se inició con una fase isotérmica a una temperatura de 45°C durante 10 minutos, seguida de una rampa de temperatura programada a 20°C/min hasta llegar a 250°C, donde se mantiene en fase isotérmica durante otros 10 minutos más. Como última etapa se programó un último gradiente hasta los 300°C a una velocidad de 30°C/min permaneciendo a esta temperatura 5 minutos más. La finalidad de esta última etapa es la eliminación de cualquier compuesto que haya podido quedar

retenido y evitar de esta manera la aparición de picos fantasma en posteriores análisis.

4.2.4.3.-Determinación e identificación de compuestos por MS

El detector de masas empleado es un 5975C VL MSD (Agilent Tech.) cuadrupolo simple, con una fuente de ionización de impacto electrónico.

- Voltaje relativo de 200 eV del fotomultiplicador.
- La temperatura del cuadrupolo es de 150°C y la de la fuente de ionización de 230°C.
- El modo de adquisición de datos fue en *SCAN con una velocidad de 5.27 espectros por segundo*.
- El rango de masas para la detección se fijó entre 40 y 300 m/z.



Figura 20. Equipo de Desorción térmica- GC/MSD utilizado

El tratamiento de datos se realizó a partir del cromatograma iónico total (TIC), que fue procesado mediante el programa de deconvolución DRS y AMDIS 32. Los compuestos

se identificaron mediante su tiempo de retención (Rt) y espectro de masas referenciado en la librería de espectros NIST 08, por medio de patrones cromatográficos.

Se consideró el “límite de detección” (LOD) de un compuesto cuando éste se pudo identificar mediante su espectro de masas, tiempo de retención y con una abundancia relativa mayor o igual a 3 veces la relación señal/ruido, mientras que para el “límite de cuantificación” (LOQ) se exigió 10 veces la relación señal/ruido (figura 21). De acuerdo con estos “límites” -LOD y LOQ-, definimos:

1. Compuestos no detectados (ND), aquéllos cuyo valor se encuentra por debajo de su LOD.
2. Compuestos no cuantificados (NQ), aquéllos que son detectados pero no es posible su cuantificación, es decir, cuyos valores se encuentran entre su LOD y su LOQ.
3. Compuestos cuantificados (Q), los que presentan valores por encima de LOQ.

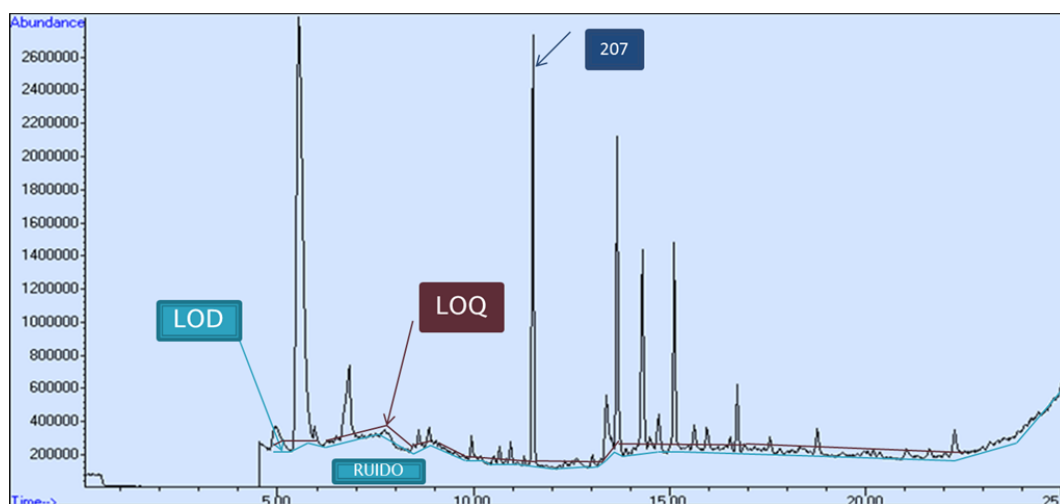


Figura 21. TIC donde se indican el LOD y LOQ para cada compuesto y el siloxano con el ion 207

Los datos cuantitativos se obtuvieron mediante la integración del área bajo la curva del ión cuantificador del espectro de masas para cada uno de los VOC, medido en cuentas por segundo (cps). Dada la posible variabilidad que pudiera existir en el proceso de desorción, los datos se normalizaron en función del área del ión 207 (correspondiente al hexametildiclotrisiloxano), utilizado como compuesto de referencia interno, procedente de los tubos de desorción.

Todos los valores cuantitativos se calcularon mediante la fórmula:

$$(ABC_{VOC}) / (ABC_{Siloxano}) \times 100$$

Donde ABC : área bajo la curva de cada compuesto.

Para el tratamiento estadístico de los datos, se acordó que los **compuestos no detectados** se les asignarían el valor correspondiente a la mitad de su límite de detección, mientras que para los **compuestos detectados pero no cuantificados**, el valor asignado sería la mitad de su límite de cuantificación.

Se asumió que un compuesto era endógeno cuando mostraba relación de valor en aire exhalado/ambiental mayor a 1 y exógeno cuando esta relación era menor de 1.

➤ Preparación de los patrones cromatográficos

La identificación de los compuestos se realizó mediante el análisis de los patrones de calibración, midiendo el tiempo de retención (Rt) bajo las condiciones cromatográficas empleadas y contrastando su espectro de masas.

Para cada uno de los patrones se prepararon dos disoluciones utilizando como disolventes: **acetona**, para inyección directa a la columna y **metanol**, para inyección mediante tubos de desorción. La selección de estos disolventes se realizó siguiendo las indicaciones de compatibilidad recomendadas por los fabricantes.

Se realizaron 6 diluciones seriadas en acetona a diferentes concentraciones, de las que se inyectó 1 μl mediante inyección directa a través del puerto de inyección y aplicando un Split de 1:6.

En una segunda fase de calibración y siguiendo la misma metodología, se prepararon disoluciones en metanol a de los diferentes patrones y se introdujo 1 μl en los tubos de desorción, utilizando un dispositivo de inyección portátil CSLRTM (figura 22). A continuación, los tubos son secados con una corriente de He a un flujo de 100 ml/min durante 20 minutos, consiguiendo la eliminación mayoritaria del disolvente pero sin llegar al punto de ruptura donde se empiezan a eliminar nuestros compuestos. Este procedimiento se ha realizado siguiendo las indicaciones del fabricante. Por último, cada tubo es retirado del CSLR y sellado con tapones DiffLok, para su posterior análisis.

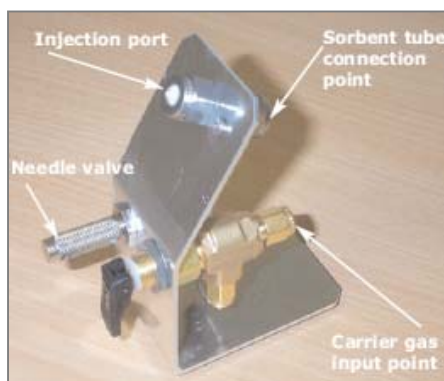


Figura 22. Dispositivo de inyección CSLRTM

➤ Proceso de validación del método analítico

El método analítico ha sido validado basándonos en los criterios descritos en la ICH Q2. *Validation of Analytical Procedures-2005*¹²⁵. Como estándar interno en los tubos se utilizó el hexametildiclotrisiloxano procedente de los tubos de desorción. Para la validación del método se han utilizado los compuestos descritos anteriormente, empleando además: 2-butanona, n-pentano, n-hexano, 2-metilpentano, 2-metilhexano, n-heptano, benceno, tolueno, estireno e isopreno. Todos ellos se hallan descritos en la bibliografía como compuestos presentes en el aire exhalado o en el aire ambiental. Nos van a servir para identificar compuestos que puedan resultar interferencias o contaminantes. Además, se pueden emplear para la validación del método analítico.

Para evaluar la estabilidad de la muestra en los tubos de desorción durante el almacenamiento, se prepararon diversos tubos cargados con los patrones y se analizaron a la hora, 24 horas, 1 semana y 2 meses.

Se ha estudiado:

- Selectividad (para detectar y cuantificar diferentes compuestos a partir del tiempo de retención de los picos cromatográficos y de la respuesta del detector).
- Linealidad del método: Para evaluar la posible respuesta lineal se analizarán 6 muestras control a diferentes concentraciones: 5, 10, 25, 50, 75 y 100 ppm, según la metodología analítica fijada en el apartado anterior. Este ejercicio se ha realizado por duplicado.
- Límite de la detección (LOD): calculado como 3 veces la relación señal/ruido.

- Límite de la cuantificación (LOQ): calculado como 10 veces el LOD.
- Exactitud: mediante el análisis de una concentración definida, realizando 3 mediciones.
- Precisión analítica: mediante el análisis a tres concentraciones diferentes, realizando 2 duplicados de cada concentración.
- Precisión intermedia: calculada como la desviación de estándar relativa (el RSD%).

En este apartado queda incluida la determinación de los parámetros analíticos para los procesos de desorción, cromatografía y espectrometría de masas.

Así mismo, las condiciones fijadas sobre los patrones disponibles, se aplicarán sobre muestras de aire exhalado.

4.2.5. Análisis estadístico

Variables

Se considerarán variables independientes: edad, género, fumador, exfumador, no fumador, personas con y sin cáncer de pulmón y personas con y sin EPOC. También se considerará variable independiente a los estadios TNM (politómica), histología, escala GOLD de EPOC.

Serán variables dependientes cuantitativas las derivadas de las determinaciones de los siguientes VOC: aldehídos y ácidos carboxílicos.

Estadística descriptiva

Previo verificación del test de normalidad de las distribuciones de los distintos VOC en aire exhalado (test de Kolmogorov-Smirnov) se empleará como índice de tendencia

central y de dispersión, la media aritmética y la desviación típica para distribuciones paramétricas; o la mediana y el rango intercuartílico, para distribuciones no paramétricas. Su representación gráfica se realizará mediante gráficos de barras de error con IC95%.

Las variables independientes y dependientes categorizadas se expresarán mediante sus frecuencias relativas y gráficamente mediante diagramas de sectores.

Estadística analítica

Las asociaciones entre la variables independientes dicotómicas y dependientes cuantitativas (VOC) se realizará mediante test de comparación de medias para muestras independientes (t Student Fischer) o de medianas (test no paramétrico de las medianas o test U-Mann Whitney). El efecto y la precisión de los mismos se verificarán mediante la diferencia de medias o de medianas y sus correspondientes IC95%.

Las asociaciones entre variables independientes politómicas y dependientes cuantitativas (VOC) se comprobarán mediante ANOVA de una vía o test de Kruskal Wallis para distribuciones paramétricas o no paramétricas, respectivamente.

Las comparaciones múltiples se verificarán mediante los test de comparación de medias anteriormente mencionadas con la corrección del grado de significación estadística en función del número de comparaciones o test de Bonferroni.

Se comprobará la correlación lineal de las variables dependientes cuantitativas mediante el test de Pearson (distribuciones paramétricas) o de Spearman (distribuciones no paramétricas). La asociación entre variables independientes y dependientes

categorías se verificará mediante el test χ^2 de Pearson, y en el caso de ser dicotómicas, la prueba exacta de Fischer. Para valorar la determinación de VOC en aire exhalado como prueba diagnóstica del CP se calculará el valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN), sensibilidad y especificidad.

Se realizará la estimación del riesgo mediante la razones de prevalencia (RP) y su correspondiente IC95%.

Se consideró como asociación estadísticamente significativa para todos los análisis estadísticos a un valor de $p < 0,05$.

Para todo ello se empleará el programa estadístico SPSS® v.17. (SPSS inc. Chicago, IL, USA) Epidat 3.1.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Validación del método analítico

Debido a la gran cantidad de compuestos presentes en el aire exhalado, la mayoría de ellos desconocidos, es difícil obtener picos cromatográficos completamente resueltos. No obstante, no es interesante el desarrollo de un método analítico específico para un compuesto hasta no estar seguros de que este tiene un valor predictivo importante de la enfermedad. El empleo de un detector de masas permite la deconvolución de los espectros de masas solapados en un pico, permitiendo discriminar las señales correspondientes al compuesto de interés y eliminando en gran medida los problemas derivados de la falta de selectividad.

Se han seguido las pautas de validación del método analítico descritas en los procedimientos ICH Q2. *Validation of Analytical Procedures*-2005, que, si bien, están orientadas a la realización de análisis en entornos regulados como la industria farmacéutica, es útil a la hora de establecer los límites de una técnica aplicada al análisis de muestras biológicas.

5.1.1 Selectividad

Se analizan las diferentes disoluciones de patrones para identificarlos mediante su espectro de masas y tiempo de retención. En las figuras 23 y 24 quedan recogidos los cromatogramas de las disoluciones en acetona y metanol respectivamente de los patrones empleados. A la derecha aparece el tiempo de retención para cada uno de ellos. Se puede

observar que el ión 207 correspondiente al hexametildiclorosiloxano aparece en la inyección mediante TDU con la utilización de los tubos de desorción. La introducción de la etapa de desorción térmica produce un desplazamiento de los tiempos de retención de aproximadamente un minuto, debido al tiempo que transcurre desde el calentamiento de la *coldtrap* y la llegada de los compuestos a la columna cromatográfica.

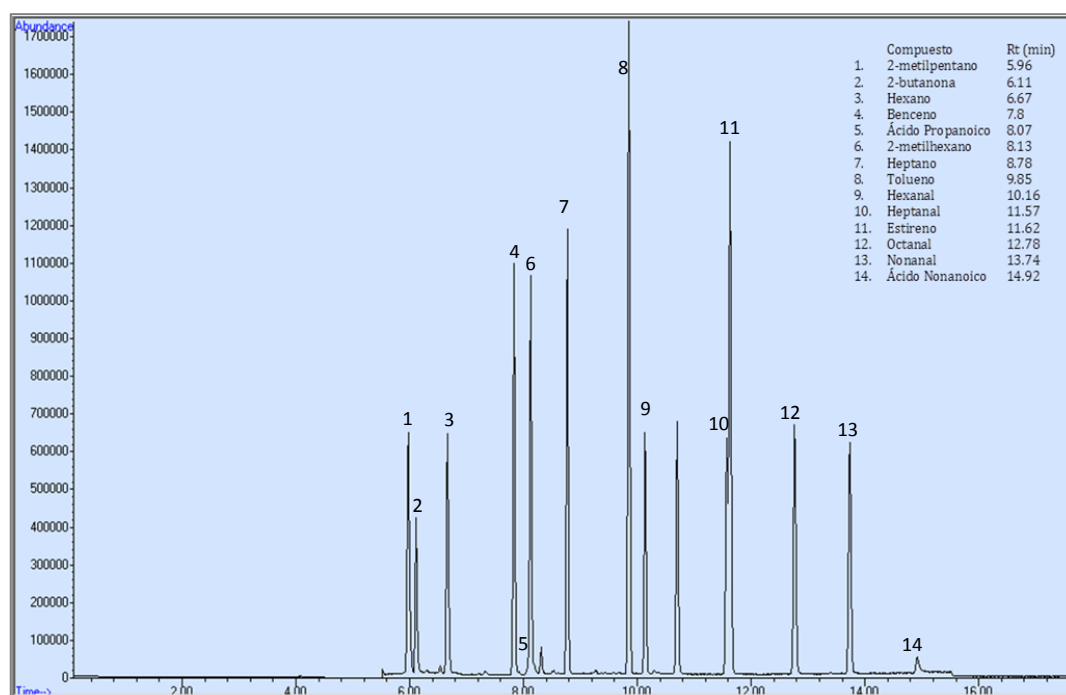


Figura 23. Cromatograma de patrones tras la inyección directa (en acetona). Identificación y tiempo de retención.

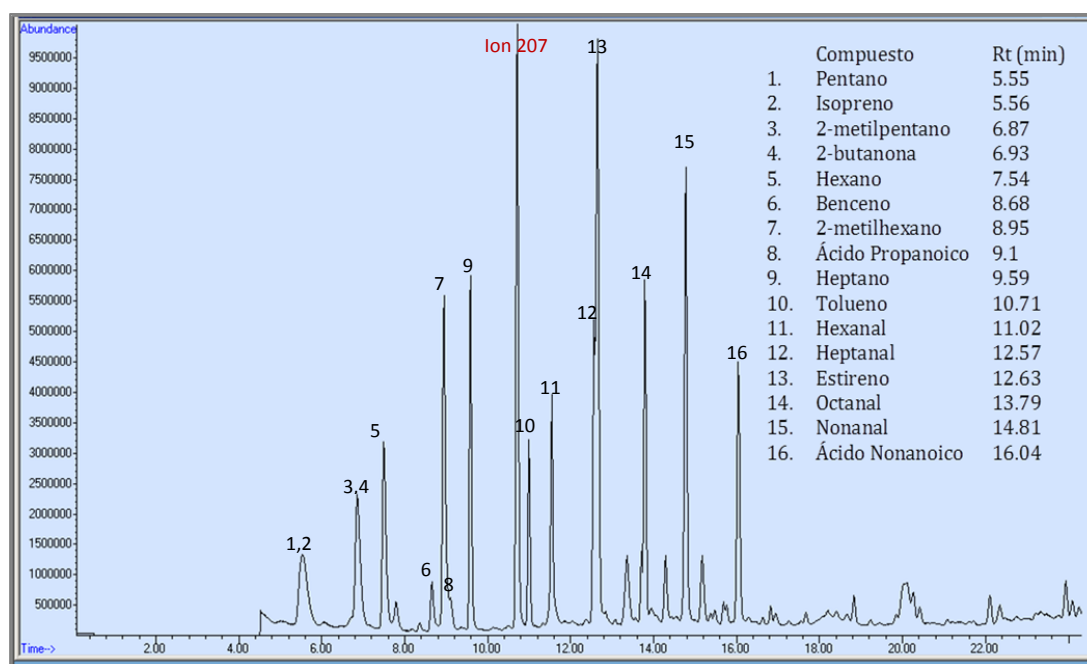


Figura 24. Cromatograma de patrones tras la inyección mediante TDU (disolución en metanol). Identificación y tiempo de retención.

En las muestras de aire de pacientes reales aparecen muchos más compuestos (más de 1600 picos cromatográficos), por lo que obtener picos completamente resueltos no es una prioridad de este método analítico. En cambio sí es prioritaria la capacidad de detectar un amplio rango de especies químicas.

5.1.2. Linealidad

El comportamiento del sistema es lineal para valores amplios de concentración, como puede apreciarse en las tablas siguientes. Tras la el ensayo con tubos de desorción cargados con patrones, se obtuvo respuesta lineal en un intervalo de concentraciones equivalentes en aire exhalado desde de los 2 ng/l hasta más de 1000 ng/l.

Tabla 18. Datos de calibración para los patrones en metanol mediante inyección con TDU.

Patrón (dilución en metanol)	Ión Tg	Rt (min)	X (10 ⁶)	C (*10 ⁶)	r ²
Pentano	43	5.55	5.16	-2.97	0.99
Isopreno	67	5.56	4.73	8.1	0.984
Hexano	57	7.54	6.02	1.04	0.993
Benceno	78	8.68	1.80	3.9	0.983
2-metilhexano	43	8.95	7.99	1.38	0.992
Ácido propanoico	74	9.1	1.99	-1.38	0.999
Heptano	43	9.59	5.58	1.65	0.993
Tolueno	91	10.71	2.16	8.51	0.992
Hexanal	44	11.02	3.38	1.47	0.991
Heptanal	70	12.57	1.99	3.54	0.995
Estireno	104	12.63	1.76	2.74	0.994
Octanal	43	13.79	2.77	1.06	0.993
Nonanal	57	14.81	4.09	2.77	0.993
Ácido nonanoico	60	16.04	3.05	-2.11	0.940

Los compuestos 2-metilpentano y 2-butanona representaron un serio problema. Este par crítico fueron eliminados del estudio por su baja resolución. Además, son dos compuestos que comparten un elevado porcentaje del espectro de masas. Todo ello, unido a que el 2-metilpentano ya estaba incluido dentro del grupo de compuestos de origen incierto, llevó a eliminarlos y no optimizar esta parte de la cromatografía.

5.1.3. Límites de detección y cuantificación

Los valores de estos límites ya normalizados frente al ión 207 de los compuestos objeto de estudio, se recogen en la tabla 19.

Tabla 19. Valores de los LOD y LOQ para cada VOC a estudio.

Compuesto	LOD	LOQ
Ácido propanoico	0.21	0.35
Hexanal	0.19	0.40
Heptanal	0.11	0.29
Octanal	0.15	0.30
Nonanal	0.32	0.43
Ácido nonanoico	0.27	0.52

5.1.4. Exactitud

La exactitud se ha evaluado como porcentaje de contenido de los patrones de concentración conocida sobre la recta de calibrado. Los datos quedan reflejados en la tabla 20.

Tabla 20. Valores de exactitud

Compuesto	% Contenido
Pentano	99%
Isopreno	103%
Hexano	102%
Benceno	93%
2-metilhexano	102%
Ácido propanoico	101%
Heptano	101%
Tolueno	101%
Hexanal	101%
Heptanal	104%
Estireno	109%
Octanal	104%
Nonanal	104%
Ácido nonanoico	101%

5.1.5. Precisión analítica

La precisión se evalúa mediante la repetibilidad instrumental y la precisión intermedia. Los datos obtenidos quedan recogidos en la tabla 21.

Tabla 21. Repetibilidad instrumental

Compuesto	Valor	RT (min)	Área (cps)
Pentano	Media	5,55	2585551
	SD	0,002	205253,44
	RSD %	0,05%	7,94%
Isopreno	Media	5,56	2604558
	SD	0,002	183364,55
	RSD %	0,04%	7,04%
Hexano	Media	7,54	1973844
	SD	0,002	158154,76
	RSD %	0,03%	8,01%
Benceno	Media	8,68	5872776
	SD	0,002	383564,15
	RSD %	0,02%	6,53%
2-metilhexano	Media	8,95	2708977
	SD	0,002	221884,47
	RSD %	0,02%	8,19%
Ácido propanoico	Media	9,10	137545
	SD	0,002	28368,51
	RSD %	0,04%	20,62%
Heptano	Media	9,59	2561910
	SD	0,002	197310,26
	RSD %	0,01%	7,70%
Tolueno	Media	10,71	8782080
	SD	0,002	489678,12
	RSD %	0,02%	5,58%
Hexanal	Media	11,02	1089128
	SD	0,002	41842,52
	RSD %	0,02%	3,84%
Heptanal	Media	12,57	1039305
	SD	0,002	33300,39
	RSD %	0,02%	3,20%
Estireno	Media	12,63	6174170
	SD	0,002	297378,28
	RSD %	0,02%	4,82%
Octanal	Media	13,76	8396950
	SD	0,002	29902,78
	RSD %	0,02%	3,56%
Nonanal	Media	14,78	1025445
	SD	0,0023	29572,50
	RSD %	0,02%	2,88%
Ácido nonanoico	Media	16,02	7889852
	SD	0,002	122715,55

RSD %	0,02%	1,55%
-------	-------	-------

Como se observa en la tabla 21, los valores de tiempo de retención muestran una mínima variabilidad, siendo muy estables y bien diferenciados. Con respecto a la respuesta en área, a pesar de que esta muestra una variabilidad sensiblemente superior a la del tiempo de retención, debe considerarse que se han realizado mediante inyección manual, por lo que los valores obtenidos son adecuados para la cuantificación. Caso aparte es el ácido propanoico, cuya respuesta en masas es más baja debido a las dificultades para su ionización.

5.1.6. Precisión intermedia

Los resultados de precisión intermedia que aparecen en la tabla 22, son adecuados para los objetivos de bioanálisis en un sistema mucho más complejo que los habituales sistemas de cromatografía de gases o de HPLC. Globalmente la respuesta presenta un coeficiente de variación en el entorno del 10%.

Tabla 22. Valores de precisión intermedia

Compuesto	Valor	RT (min)	Área (cps)
Pentano	Media	5,55	2532780
	SD	0,004	348004,04
	RSD %	0,06%	13,74%
Isopreno	Media	5,56	2547224
	SD	0,0033	304138,54
	RSD %	0,05%	11,94%
Hexano	Media	7,54	1926886
	SD	0,002	261478,43
	RSD %	0,03%	13,57%
Benceno	Media	8,68	5703674
	SD	0,003	708966,69

	RSD %	0,04%	12,43%
2-metilhexano	Media	8,95	2634854
	SD	0,003	355178,39
	RSD %	0,03%	13,48%
Ácido propanoico	Media	9,10	133197
	SD	0,003	24135,32
	RSD %	0,04%	18,12%
Heptano	Media	9,59	2493616
	SD	0,003	330154,80
	RSD %	0,03%	13,24%
Tolueno	Media	10,71	8544158
	SD	0,003	1006501,8
	RSD %	0,03%	11,78%
Hexanal	Media	11,02	1063268
	SD	0,002	118767,03
	RSD %	0,02%	11,17%
Heptanal	Media	12,57	1022731
	SD	0,002	105034,42
	RSD %	0,02%	10,27%
Estireno	Media	12,63	6018995
	SD	0,002	684359,75
	RSD %	0,02%	11,37%
Octanal	Media	13,76	824743
	SD	0,004	87505,186
	RSD %	0,03%	10,61%
Nonanal	Media	14,78	1007232
	SD	0,003	101126,07
	RSD %	0,02%	10,04%
Ácido nonanoico	Media	16,02	7796375
	SD	0,003	132196,44
	RSD %	0,03%	1,69%

5.1.7. Estabilidad de muestra

Como se muestra en la figura 25, la muestra es estable a los 60 días cuando se conservan con un cierre hermético. Sin embargo, los aldehídos muestran una pérdida del

10% cuando la muestra es conservada con el cierre de los tapones DiffLok, observándose un aumento de ácido nonanoico proporcional a la pérdida de nonanal.

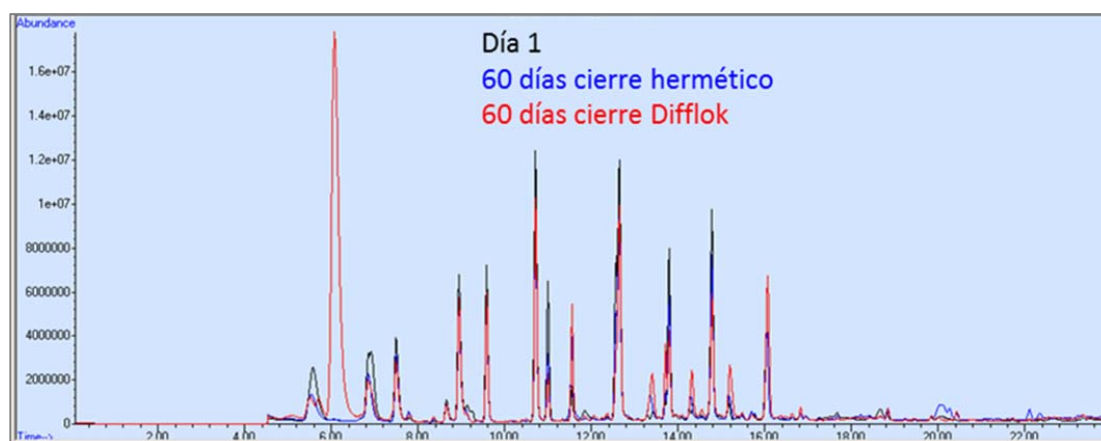


Figura 25. Análisis de estabilidad de los compuestos y fugas en los tubos de desorción a los dos meses.

A la vista de estos resultados, puede concluirse que el método es adecuado para la búsqueda de nuevos marcadores en muestras de aire exhalado de pacientes.

5.2. Análisis demográfico

Nuestra población de estudio consta de 210 personas distribuidas en tres grandes grupos, cuyas características demográficas quedan recogidas en la tabla 19.

Tabla 23. Características demográficas de la población de estudio

	Controles=89		EPOC=40		CP=81	
Edad (media en años)*	49.3 (9.5)		74.2(10.0)		68.5(11.1)	
Género						
Hombres	42	(47%)	37	(93%)	64	(79%)
Mujeres	47	(53%)	3	(7%)	17	(21%)
Historia de Tabaquismo						
Fumadores	30	(34%)	34	(85%)	50	(62%)
Exfumadores	24	(27%)	5	(12.5%)	22	(27%)
no fumadores	35	(39%)	1	(2.5%)	9	(11%)
Tabaquismo (IPA)*						
Fumadores	30.9(18.6)		123(29.5)		77.5(50.6)	
Ex fumadores	26.5(21.6)		72.5(34.3)		63.0(34.1)	
Histología (%)						
Epidermoide	-		-		27.2 %	
Adenocarcinoma	-		-		39.5%	
Indiferenciado	-		-		18.5%	
Células Grandes	-		-		2.5%	
Carcinoide	-		-		1.2%	
Microcítico	-		-		11.1%	
TNM						
IA	-		-		8.6%	
IB	-		-		6.2%	
IIA	-		-		7.4%	
IIB	-		-		2.5%	
IIIA	-		-		28.4%	
IIIB	-		-		14.8%	
IV	-		-		32.1%	
GOLD(%)						
1	-		10%		13.6%	
2	-		32.5%		25.9%	
3	-		25%		13.6%	
4	-		32.5%		17.3%	
Sin EPOC			-		29.6%	

*media

- **Grupo 1: GRUPO CONTROL**

Compuesto por 89 personas, todas ellas voluntarias, asintomáticas y presuntamente sanas, con una edad media de 49,3 (9.5) años. En cuanto a la distribución por género, un 47% eran hombres y un 53% mujeres. De ellos, un 39% eran no fumadores, un 34% fumadores y un 27% exfumadores, con un consumo de tabaco de 30.9 (18.6) paquetes por año (IPA) para los fumadores, e IPA de 26.5 (21.6) para los exfumadores. (Figuras 26 y 27).

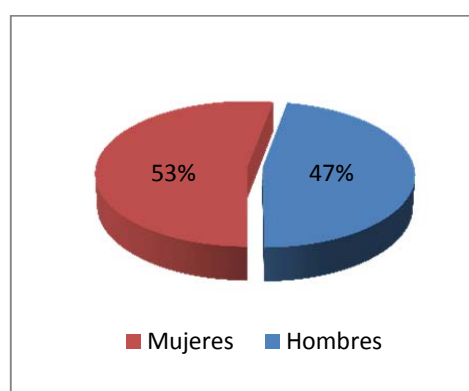


Figura 26. Distribución por género en el grupo control.

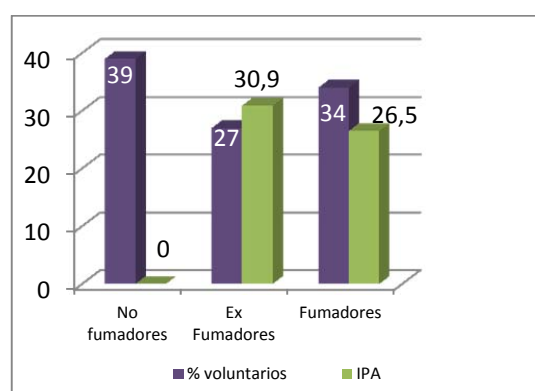


Figura 27. Distribución por tabaquismo e IPA en el grupo control

- **Grupo 2: GRUPO EPOC**

Compuesto por 40 pacientes con diagnóstico de EPOC en estabilidad clínica, con una edad media de 74.2 (10.0) años. El 93% eran hombres y un 7% mujeres. Con respecto al tabaquismo, el 85% eran fumadores activos con un IPA de 123 (29.5), el 12.5% eran exfumadores con un IPA de 72,5(34.3) y el 2.5% no fumadores, correspondiente a una persona con déficit de α 1-antitripsina (figura 28). En cuanto a la clasificación GOLD, el 10% eran EPOC leves (GOLD 1), 32.5% eran moderados (GOLD 2), el 25% severos (GOLD 3) y el 32.5% graves (GOLD 4), (figura 29).

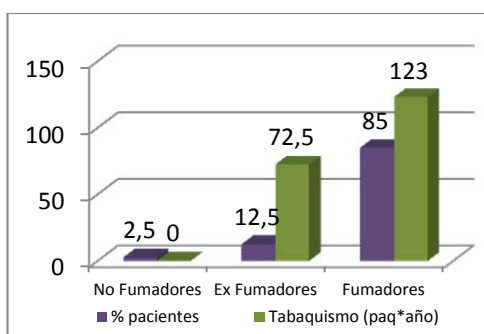


Figura 28. Porcentaje de pacientes en función del tabaquismo e IPA en el grupo EPOC.

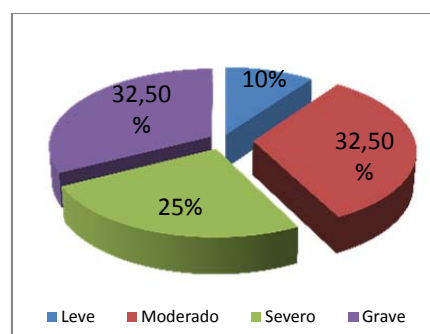


Figura 29. Distribución en % de los pacientes con EPOC según escala GOLD.

Grupo 3: GRUPO CÁNCER DE PULMÓN

Compuesto por 81 pacientes con diagnóstico histológico de cáncer de pulmón, con una edad media de 68.5 (11.1) años, 64 de ellos hombres (79%) y 17 mujeres (21%) (figura30). El 62% eran fumadores activos con un IPA de 77.5 (50.6), el 27% exfumadores, con un IPA de 63.0 (34.1), y el 11% restante, no fumadores (figura 31).

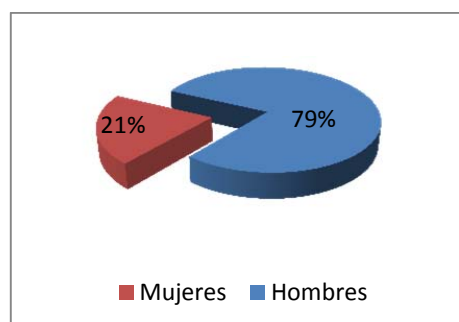


Figura 30. Distribución por género del grupo CP.

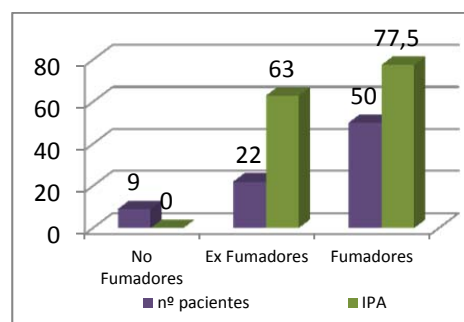


Figura 31. Porcentaje de pacientes en función del tabaquismo e IPA en el grupo CP.

El grupo histológico predominante entre los NICP eran adenocarcinomas con un 39.5% y epidermoides con un 27,2%. Los carcinomas no microcíticos indiferenciados representaron el 18,5%, mientras que los de células grandes sólo un 2,5%. El ICP se diagnosticó en el 11,1% de los casos, y el carcinoide en el 1,2% (figura 32). En referencia al estadio del tumor (TNM – Se utilizó la clasificación de

Mountain de 1997), el 75,3% de los casos correspondieron a estadios avanzados – IIIA (28,4%), IIIB (14,8%) y IV (32,1%), y el resto, 24,7% a los estadios IA (8,6%), IB (6,2%), IIA (7,4%) y IIB (2,5%) (figura 33).

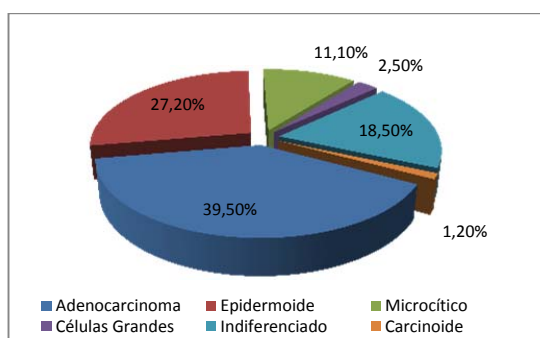


Figura 32. Distribución del grupo CP en función de la histología.

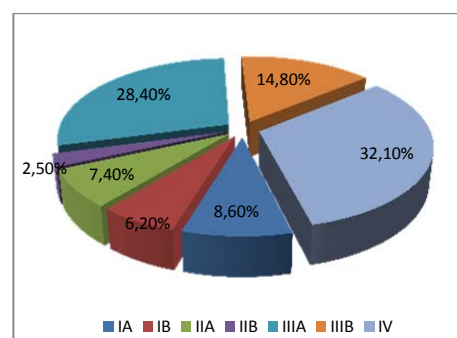


Figura 33. Distribución del grupo CP según estadio TNM

El 70% de los casos de CP están diagnosticados, a su vez, de EPOC, la mayoría de carácter moderado (26%). El 30% restante no presentaba enfermedad obstructiva (figura 34). La distribución por histología y estadio diferenciando entre CP con EPOC y sin EPOC queda recogido en las figuras 35 y 36 respectivamente.

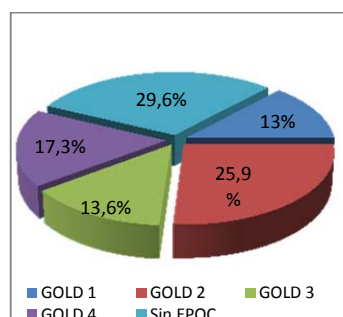


Figura 34. Distribución del grupo CP según escala GOLD

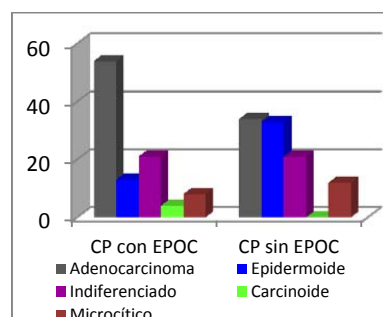


Figura 35. Histología del grupo CP diferenciando entre CP con EPOC y CP sin EPOC.

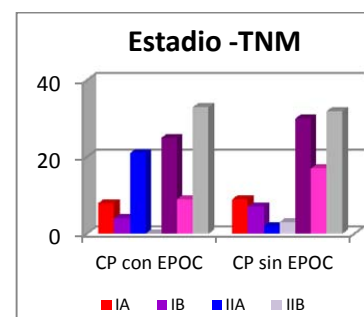


Figura 36. Estadio TNM del grupo CP diferenciando entre CP con EPOC y CP sin EPOC.

5.3. Categorización según la determinación de los VOC

Se obtuvieron 3 categorías según los valores detectados fueran *a) cuantificados (Q)*, *b) no cuantificados (NQ)*, y *c) no detectados (ND)*, según criterios definidos anteriormente.

La distribución de las frecuencias queda recogida en la tabla 24 y representada en la figura 37.

Tabla 24. Distribución de frecuencias en función de la categoría

	Categorías			Total
	No detectado	No cuantificado	Cuantificado	
Hexanal	155 (74%)	13 (6%)	42 (20%)	210
Heptanal	124 (59%)	9 (4%)	77 (37%)	210
Octanal	173 (82%)	8 (4%)	29 (14%)	210
Nonanal	112 (53%)	14 (7%)	84 (40%)	210
Ácido Propanoico	91 (43%)	10 (5%)	109 (52%)	210
Ácido Nonanoico	167 (79.5%)	1 (0.5%)	42 (20%)	210

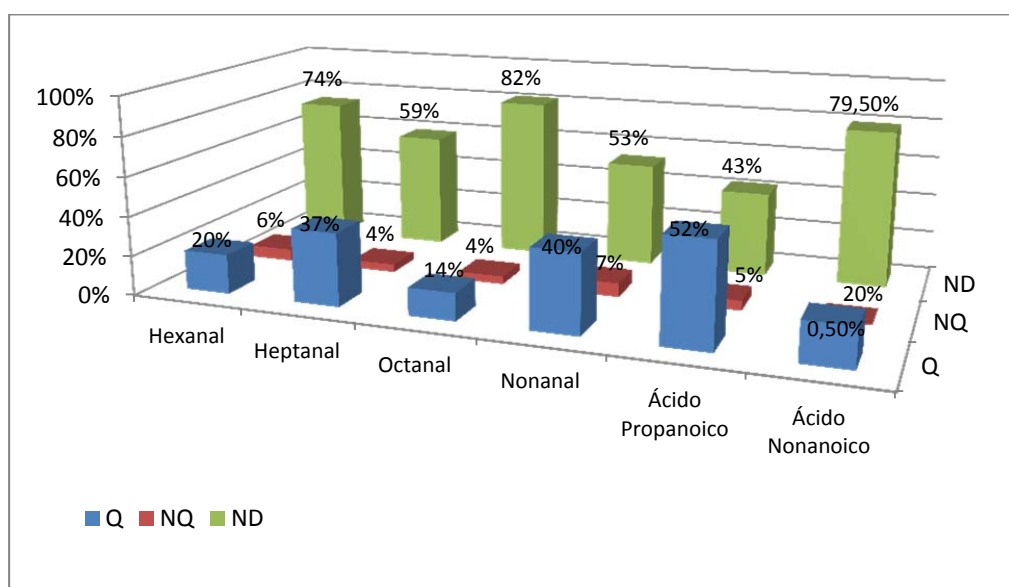


Figura 37. Distribución de frecuencias (%) según las categorías de no detectado (ND), no cuantificado (NQ) y cuantificado (Q).

En la figura 38 quedan representados el porcentaje de los VOC detectados en función de los diferentes grupos de estudio, Control, EPOC y CP.

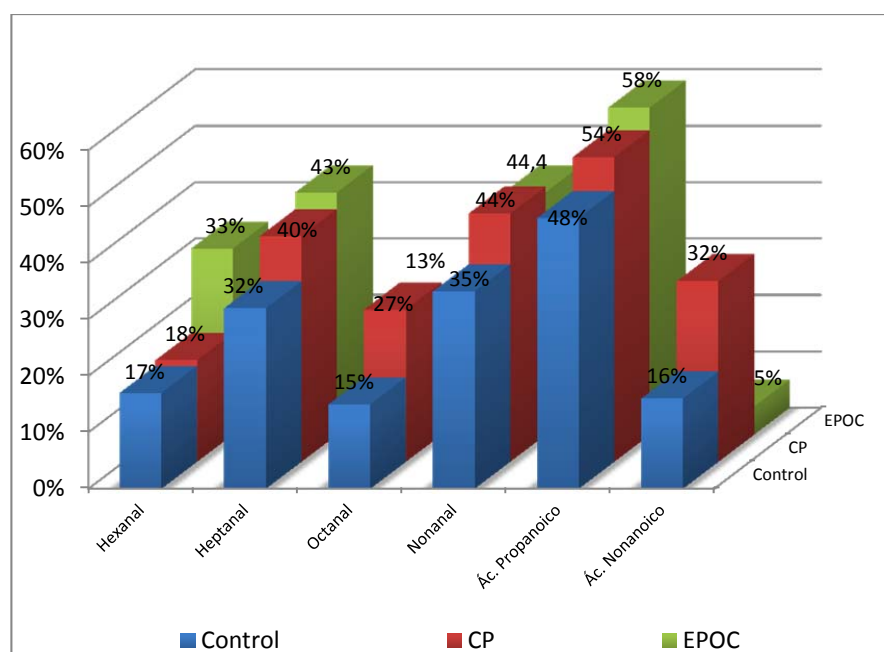


Figura 38. Porcentaje de personas en los que se detecta la presencia de los VOC para cada grupo de estudio

5.3.1. Estudio del grupo control

El grupo control se divide en tres categorías en función del tabaquismo: no fumadores, exfumadores y fumadores activos, según fueron descritos en el apartado 4.2.1 de Material y Métodos. Sus características demográficas están recogidas en la tabla 19 - características demográficas de la población de estudio.

Tras aplicar el test de Kolmogorov-Smirnov se comprobó que la distribución de frecuencias para los diferentes VOC no cumplía criterios de normalidad, por lo que se tomó como valor de referencia de medida de tendencia central, la mediana y el rango intercuartílico. La distribución de las frecuencias queda recogida en la tabla 25.

Tabla 25. Distribución de frecuencias de detección de los VOC en el grupo control.

	Categorías		
	No detectado	No cuantificado	Cuantificado
Hexanal	64 (72%)	10 (11%)	15 (17%)
Heptanal	56 (63%)	5 (6%)	28 (31%)
Octanal	72 (81%)	4 (4%)	13 (15%)
Nonanal	49 (55%)	9 (10%)	31 (35%)
Ácido Propanoico	41 (46%)	5 (6%)	43 (48%)
Ácido Nonanoico	74 (83%)	1 (1%)	14 (16%)

En la tabla 26 se recogen los valores de mediana (IQR) para cada uno de los VOC estudiados referidos a los diferentes subgrupos del grupo control. Únicamente se observan diferencias estadísticamente significativas para el **nonanal** entre las 3 categorías dentro del **GRUPO CONTROL**: no fumadores 0.160 (0.160 – 0.215), ex fumadores 0.160 (0.160 – 5.650) y fumadores 2.050 (0.160 – 10.25), ($p=0.04$). Los valores de p , basados en el test de Mann Whitney, comparando los grupos dos a dos, quedan reflejados en la figura 39.

Tabla 26. Mediana⁽ⁱ⁾ y rango intercuartílico de cada VOC en cada grupo y valor de p^*

	Mediana y rango intercuartílico			p*
	No fumadores=35	Exfumadores=24	Fumadores=30	
Hexanal	0.095 (0.095- 0.200)	0.095 (0.095 - 0.200)	0.095 (0.095 – 6.19)	0.181
Heptanal	0.055 (0.055 -0.930)	0.055 (0.055 – 1.300)	0.055 (0.055 – 1.960)	0.701
Octanal	0.075 (0.075 - 0.750)	0.075 (0.075 - 0.750)	0.075 (0.075 - 0.750)	0.604
Nonanal	0.160 (0.160 – 0.215)	0.160(0.160 – 5.650)	2.050 (0.160 – 10.25)	0.041
Ácido Propanoico	0.175 (0.105 – 2.090)	0.105(0.105 – 1.840)	2.200 (0.105 – 6.27)	0.153
Ácido Nonanoico	0.135 (0.135 - 0.260)	0.135 (0. 135 - 0. 135)	0.135 (0. 135 - 0. 135)	0.560

* Test de Kruskal Wallis

⁽ⁱ⁾Valores adimensionales calculados mediante la fórmula $(ABC_{VOC}) / (ABC_{Siloxano}) \times 100$, donde ABC : área bajo la curva del ion cuantificador medido en cps para cada VOC y Siloxano que es utilizado como compuesto de referencia interno.

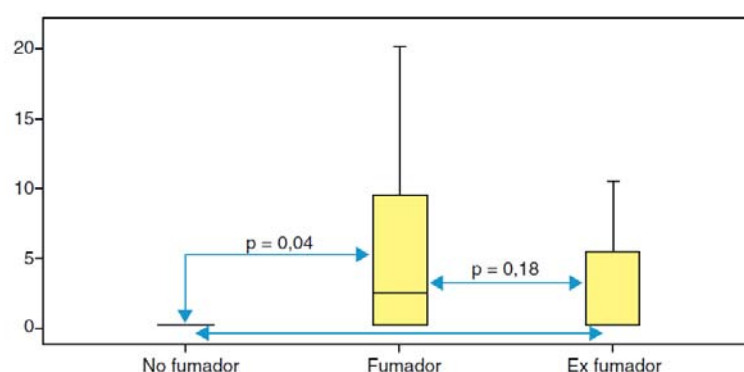


Figura 39. Representación de medianas e IQR de nonanal referido a los 3 subgrupos del grupo control. Valores de p basados en el test de la U de Mann Whitney

Aunque la dispersión de datos es elevada, los resultados obtenidos en fumadores y exfumadores - es decir, en todas aquellas personas que tienen o han tenido contacto con el tabaco- , resultan bastante coincidentes, tal como aparece reflejado en la figura 39, de modo que los valores de los primeros se solapan en los resultados de los segundos. Este comportamiento nos ha llevado a considerar a fumadores y exfumadores en un único grupo de tabaquismo, al que enfrentaremos al subgrupo de no fumadores, para estudiar el efecto del tabaco.

En el estudio de comparación de los datos obtenidos entre estos dos grupos, el **nonanal** vuelve a mostrar significación estadística entre ambos -tabaquismo vs no tabaquismo- (test de U de Mann Whitney ($p= 0.019$)). El resto de los VOC no muestran diferencias entre los grupos citados (tabla 27).

Resultados

Tabla 27. Mediana⁽ⁱ⁾ de cada uno de los marcadores en el grupo control y el valor de p que evalúa la diferencia entre ellos.

	Mediana		Valor de p*
	No fumadores N=35	Fumadores + exfumadores N=54	
Hexanal	0.095	0.095	0.256
Heptanal	0.055	0.055	0.427
Octanal	0.075	0.075	0.361
Nonanal	0.16	0.215	0.019
Ácido Propanoico	0.175	0.448	0.225
Ácido Nonanoico	0.135	0.135	0.285

*Test U de Mann-Whitney

⁽ⁱ⁾Valores adimensionales calculados mediante la fórmula $(ABC_{VOC}) / (ABC_{Siloxano}) \times 100$, donde ABC : área bajo la curva del ion cuantificador medido en cps para cada VOC y Siloxano que es utilizado como compuesto de referencia interno.

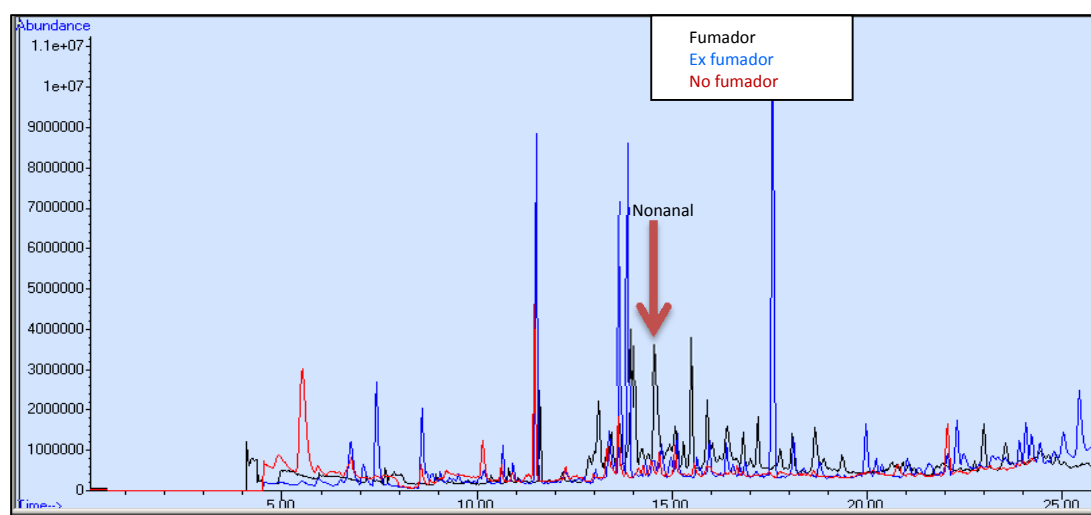


Figura 40. Cromatogramas (TIC) superpuestos para los tres subgrupos del grupo Control.

En la figura 40 se muestran los TIC superpuestos de los tres subgrupos del grupo control, trazados en diferente color. Se puede observar la presencia de **nonanal** en el TIC correspondiente a un fumador.

Se realiza un análisis cualitativo de detección / no detección de VOC en función de nuestros límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) previamente establecidos y definidos en *Materiales y Métodos*. La distribución de frecuencias en porcentaje y los valores de “p” calculados con χ^2 quedan recogidos en la tabla 28. De nuevo el **nonanal** fue el único compuesto que presentó diferencias estadísticamente significativas entre todos y cada uno de los subgrupos del **grupo control** (*no fumadores 20%, fumadores 53% y exfumadores 29%*), con una $p=0.016$.

Tabla 28. Comparación del porcentaje según tabaquismo en los que se detectan los marcadores en los diferentes grupos. Porcentaje en cada grupo y valor de p basado en el test de χ^2 de heterogeneidad

	No fumadores (%)	Exfumadores (%)	Fumadores (%)	p*
Hexanal	11.4	8.3	30.0	0.059
Heptanal	25.7	37.5	33.3	0.609
Octanal	8.6	20.8	16.7	0.393
Nonanal	20.0	29.2	53.3	0.016
Ácido Propanoico	51.4	50.0	60.0	0.711
Ácido Nonanoico	20.0	12.5	13.3	0.670

* Test de χ^2 de Pearson

Dado que, en nuestra muestra, los valores de nonanal están relacionados con el consumo de tabaco, decidimos estudiar la relación entre la cantidad de tabaco fumado (expresado en IPA) y la cantidad de nonanal exhalado. Tras aplicar el test de correlación lineal de Spearman, no observamos correlación estadística ($p=0.823$).

Tampoco se encontró correlación entre el nonanal con la edad y el género (hombres: $r=0,05$, $p=0,753$ y en mujeres: $r=0,081$, $p=0,588$).

5.3.2. Estudio del grupo EPOC

El grupo EPOC lo conformaron 40 personas, con una edad media de 74.2 (10.0) años, donde el 93% de ellos eran hombres. Con respecto al hábito tabáquico, el 85% eran fumadores activos con un IPA de 123 (29.5). El 12.5% eran exfumadores con un IPA de 72.5 (34.3), y solamente un caso (2.5%) era no fumador correspondiente a un paciente con un déficit de α 1-antitripsina.

En cuanto a la gravedad de la enfermedad, según la escala GOLD, el 10% eran EPOC leves (GOLD 1), un 32.5% eran moderados (GOLD 2), el 25% severos (GOLD 3) y el 32.5% graves (GOLD 4). Todas estas características quedan recogidas en la tabla 19.

Tras aplicar el test de Kolmogorov-Smirnov se comprobó que la distribución de frecuencias para los diferentes VOC no cumplía criterios de normalidad, por lo que se tomó como valor de referencia de medida de tendencia central, la mediana y el rango intercuartílico. La distribución de las frecuencias queda recogida en la tabla 29 y representados en la figura 41.

Tabla 29. Distribución de frecuencias en la detección de los VOC en el grupo EPOC

	Categorías		
	No detectado	No cuantificado	Cuantificado
Hexanal	26 (65%)	1 (2.5%)	23 (57.5%)
Heptanal	23 (57.5%)	0 (0%)	17 (42.5%)
Octanal	34 (81%)	1 (2.5%)	5 (12.5%)
Nonanal	23 (85%)	0 (0%)	17 (42.5%)
Ácido Propanoico	17 (42%)	0 (0%)	23 (57.5%)
Ácido Nonanoico	38 (95%)	0 (0%)	2 (5%)

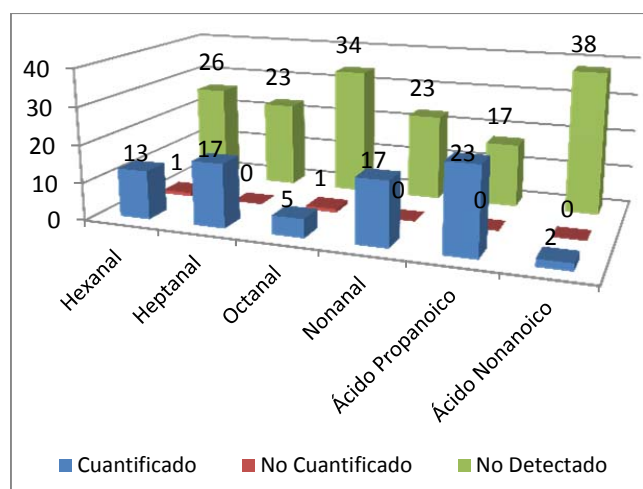


Figura 41. Distribución de frecuencias

En la tabla 30 quedan recogidos los valores de mediana (IQR) para cada uno de los VOC estudiados referidos al grupo EPOC.

Tabla 30. Mediana⁽ⁱ⁾ y rango intercuartílico para cada VOC en el grupo EPOC

Grupo EPOC	
Hexanal	0.095 (0.095- 1.980)
Heptanal	0.055 (0.055 -1.810)
Octanal	0.075 (0.075 - 0.750)
Nonanal	0.160 (0.160 – 5.400)
Ácido Propanoico	1.430 (0.105 – 4.605)
Ácido Nonanoico	0.135 (0.135 - 0.135)

⁽ⁱ⁾Valores adimensionales calculados mediante la fórmula $(ABC_{VOC}) / (ABC_{Siloxano}) \times 100$, donde ABC : área bajo la curva del ion cuantificador medido en cps para cada VOC y Siloxano que es utilizado como compuesto de referencia interno.

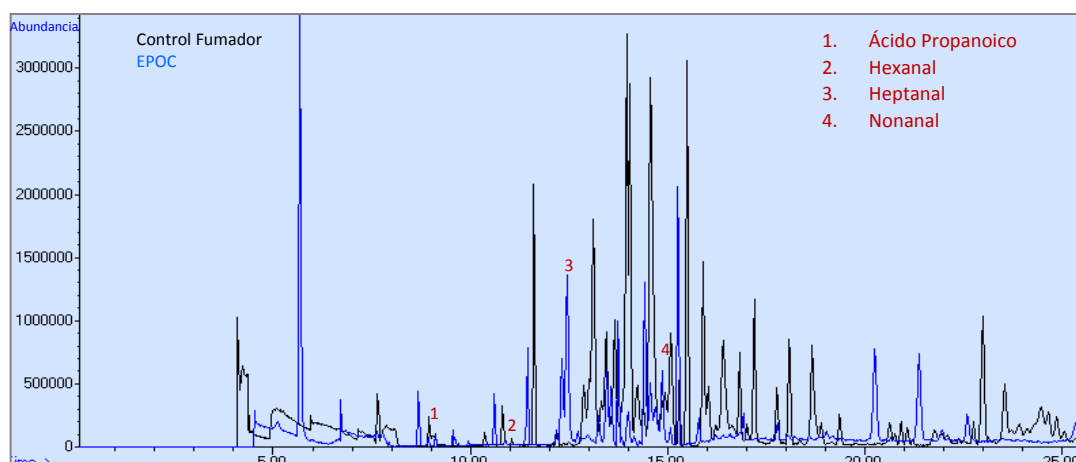


Figura 42. TIC correspondientes al grupo EPOC y grupo control

En la figura 42 se muestran los cromatogramas superpuestos de los grupos control y EPOC, trazados en negro y azul respectivamente. Quedan señalados diferentes VOC detectados

Estudio del grupo EPOC frente al grupo control

Se han realizado dos tipos de estudio, cuantitativo y cualitativo de detección/no detección.

➤ Análisis cuantitativo:

Los resultados están recogidos en la tabla 31, donde tras aplicar test U de Mann-Whitney, no se han observado diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los VOC entre los grupos de **EPOC y control**.

En la figura 43 se muestran los cromatogramas superpuestos de un paciente con EPOC (color rojo), control fumador (color azul) y control ex fumador (color negro). Quedan

indicados los VOC de estudio que son detectados.

Tabla 31. Comparación de marcadores entre grupos: Controles y EPOC. Valores de p^* basados en test de U de Mann-Whitney.

EPOC vs. Controles	
	Valor de p^*
Hexanal	0.362
Heptanal	0.370
Octanal	0.591
Nonanal	0.904
Ácido Propanoico	0.299
Ácido Nonanoico	0.063

*Test de U de Mann-Whitney

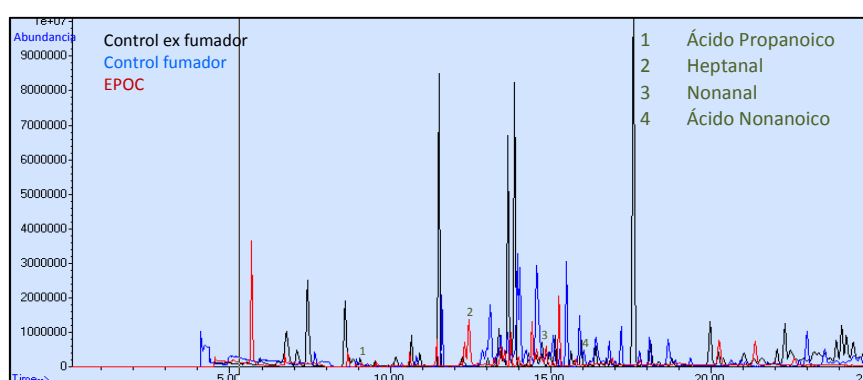


Figura 43. Cromatogramas grupo EPOC y controles fumador y ex fumador.

➤ Análisis cualitativo

Siguiendo la misma sistemática del análisis cuantitativo, realizamos a continuación el estudio de los valores de OR para estudio cualitativo de detección/no detección de los VOC. En la tabla 32 quedan reflejados los valores de OR basados en la regresión logística, en la que tampoco se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en ningún compuesto entre los grupos de EPOC y control, al igual que sucede en el estudio

cuantitativo. No obstante, es de notar que el hexanal alcanza una $p=0,05$, muy próxima al nivel de significación.

Tabla 32. Relación entre la presencia de alguna cantidad detectable de marcadores y la presencia de EPOC frente al grupo control. OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística.

	Controles	EPOC	Valor de p
Hexanal	1.00	2.38 (1.00-5.64)	0.05
Heptanal	1.00	1.61 (0.75– 3.48)	0.223
Octanal	1.00	0.84(0.28– 2.53)	0.75
Nonanal	1.00	1.45(0.68– 3.13)	0.338
Ácido Propanoico	1.00	1.16(0.54– 2.45)	0.707
Ácido Nonanoico	1.00	0.28(0.06– 1.31)	0.105

*OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística

5.3.3. Estudio del grupo cáncer de pulmón

El grupo CP lo conformaban 81 personas con diagnóstico histológico de NICP e ICP. La edad media era de 68.5 (11.1) años, donde el 79% eran hombres y el 21 mujeres. El 62% eran fumadores activos con un IPA de 77.5 (50.6); el 27% son exfumadores con un IPA de 63.0 (34.1), y un 11% eran no fumadores (8mujeres y 1 hombre, todos ellos con histología de adenocarcinoma). Todos estos datos quedan recogidos en la tabla 19 de características demográficas de la población de estudio.

En referencia a la histología de los NICP, el 39.5% eran adenocarcinomas, el 27.2% epidermoides, los carcinomas no microcíticos indiferenciados el 18,5% y células grandes un 2,5%. El ICP supone el 11,1% de los casos y el carcinoide un 1,2%. En cuanto al estadio del tumor (TNM)¹⁰³, el 75,3% de los casos correspondían a estadios avanzados – IIIA un

28,4%, IIIB un 14,8% y IV un 32,1% - mientras que para los estadios IA eran de un 8,6%, IB de un 6,2%, IIA de un 7,4% y IIB de un 2,5%.

El 70% de los casos de CP están diagnosticados, a su vez, de EPOC, correspondiendo el grupo mayor a GOLD 2 (26%). El 30% restante no presentaban enfermedad obstructiva.

La distribución de las frecuencias de cuantificación de los diferentes VOC queda recogida en la tabla 33 y en la figura 44.

Tabla 33. Distribución de frecuencias de VOC detectados en el grupo CP.

	Categorías		
	No detectado	No cuantificado	Cuantificado
Hexanal	65 (80%)	2 (2.5%)	14 (27%)
Heptanal	45 (56%)	4 (5%)	32 (39%)
Octanal	67 (83%)	3 (4%)	11 (13.5%)
Nonanal	40 (49%)	5 (6%)	36 (44%)
Ácido Propanoico	33 (41%)	4 (5%)	44 (54%)
Ácido Nonanoico	55 (68%)	0 (0%)	26 (32%)

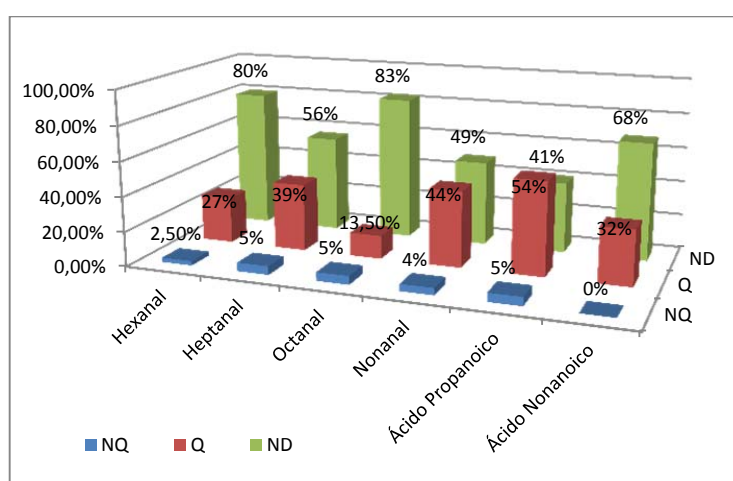


Figura 44. Distribución de frecuencias en la detección de los diferentes VOC

Al igual que en los dos grupos anteriores, tras aplicar el test de Kolmogorov-Smirnov se comprobó que ninguna distribución de valores de detección cumplía criterios de normalidad, por lo que se tomó como valor de referencia de medida de tendencia central, la mediana y el rango intercuartílico (tabla 34).

Tabla 34. Mediana⁽ⁱ⁾ y rango intercuartílico de cada VOC en el Grupo CP

Cáncer de pulmón	
Hexanal	0.095 (0.095 - 0.095)
Heptanal	0.055 (0.055 - 1.460)
Octanal	0.075 (0.075 - 0.750)
Nonanal	0.215 (0.160 – 5.600)
Ácido Propanoico	0.109 (0.105 – 3.020)
Ácido Nonanoico	0.135 (0.135 –3.990)

⁽ⁱ⁾Valores adimensionales calculados mediante la fórmula $(ABC_{VOC}) / (ABC_{Siloxano}) \times 100$, donde ABC : área bajo la curva del ion cuantificador medido en cps para cada VOC y Siloxano que es utilizado como compuesto de referencia interno.

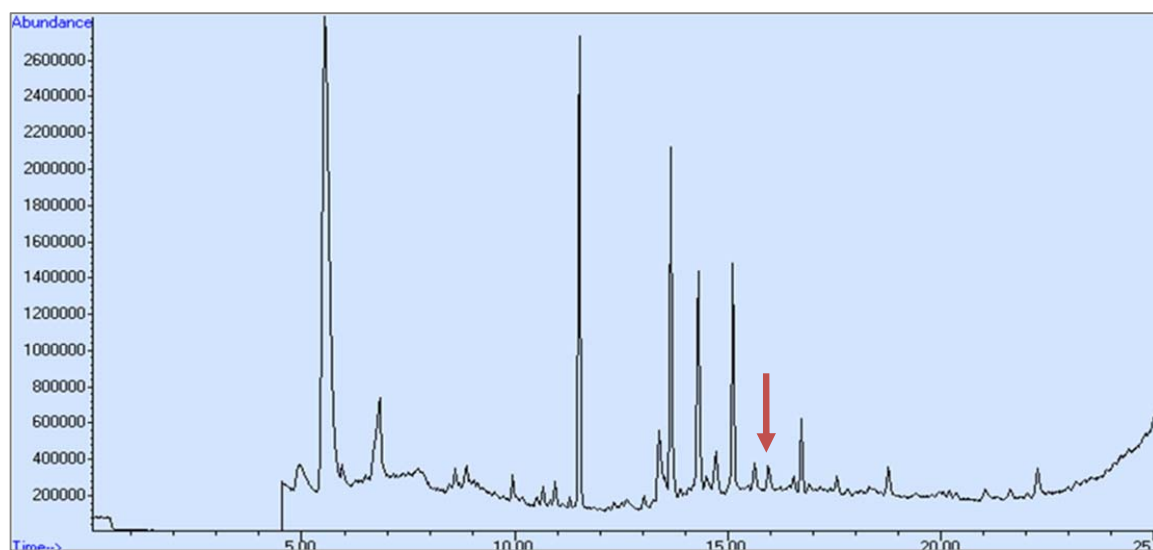


Figura 45. Cromatograma de paciente con CP.

En la figura 45 se muestra un cromatograma de un paciente con CP. Se indica un pico cromatográfico en el minuto 15.9 para su identificación mediante espectrometría de masas.

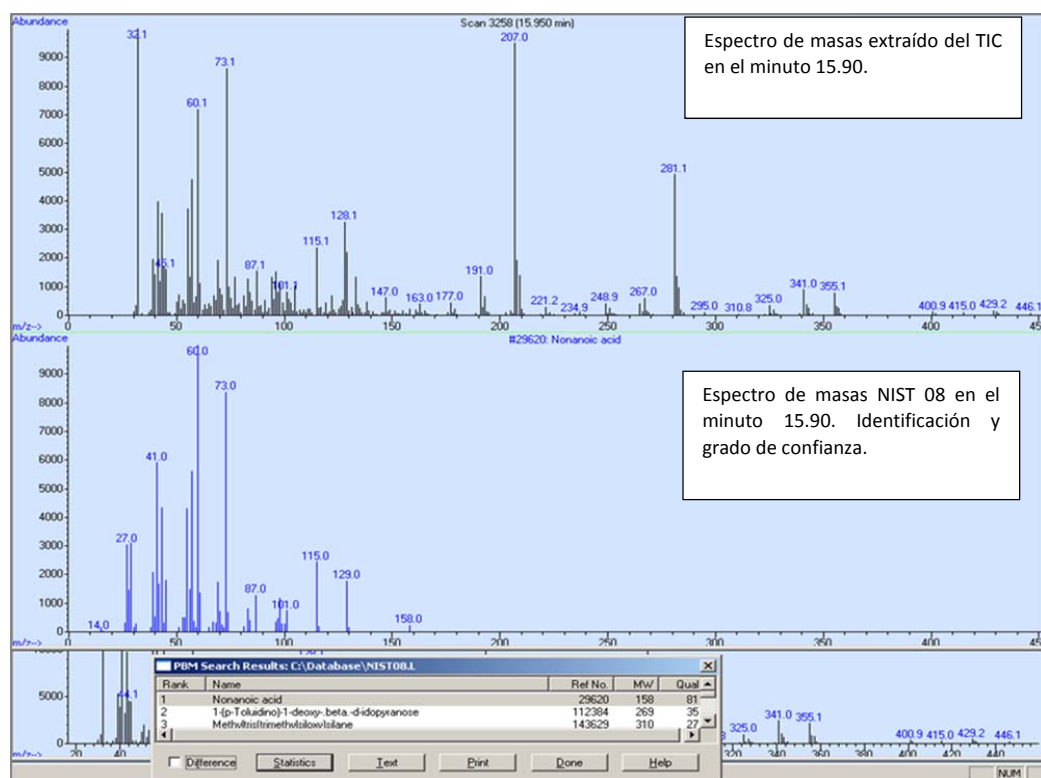


Figura 46. Espectro de masas extraído del cromatograma (TIC) en el minuto 15.90 y comprobación con el espectro de masas de la librería espectral NIST 08.

En la figura 46 aparece el espectro de masas del pico cromatográfico correspondiente del Rt 15,90 min. La identificación del compuesto se analizó con el programa informático: ChemStation mediante la comparación del espectro extraído del TIC y de la NIST 08. Los resultados muestran que el ácido nonanoico ocupa el primer puesto en el ranking de probabilidad con una fiabilidad del 81%.

Estudio del grupo CP frente al grupo control

En cuanto a la comparación de los grupos de estudio, se han realizado dos comparaciones (análisis cuantitativo y cualitativo) enfrentando el grupo cáncer de pulmón a la totalidad del grupo control.

- i. Los datos del estudio cuantitativo quedan recogidos en la tabla 35, que tras aplicar el test de U de Mann-Whitney, sólo se observan diferencias estadísticamente significativas en el **ácido nonanoico** con una $p=0.011$.

Tabla 35. Comparación de VOC entre los grupos CONTROL y CP.
Valores de p^* basados en el test de U de Mann-Whitney

	Control vs CP
Hexanal	0.276
Heptanal	0.308
Octanal	0.769
Nonanal	0.454
Ácido propanoico	0.534
Ácido nonanoico	0.011

* Test U de Mann-Whitney

- ii. Los datos del estudio cualitativo se recogen en la tabla 36. Los valores de OR para estudio de detección/no detección muestran que el **ácido nonanoico** es el único compuesto que presenta diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 36. Relación entre la presencia de VOC en el grupo de cáncer frente al grupo Control y frente al grupo EPOC. OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística.

	Controles	CP	Valor de p
Hexanal	1.00	1.03 (0.46-2.29)	0.941
Heptanal	1.00	1.42 (0.76 – 2.68)	0.274
Octanal	1.00	0.92 (0.39 – 2.19)	0.848
Nonanal	1.00	1.57(0.85 – 2.93)	0.152
Ácido Propanoico	1.00	1.24(0.68 – 2.28)	0.484
Ácido Nonanoico	1.00	2.53(1.21 – 5.29)	0.014

*OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística

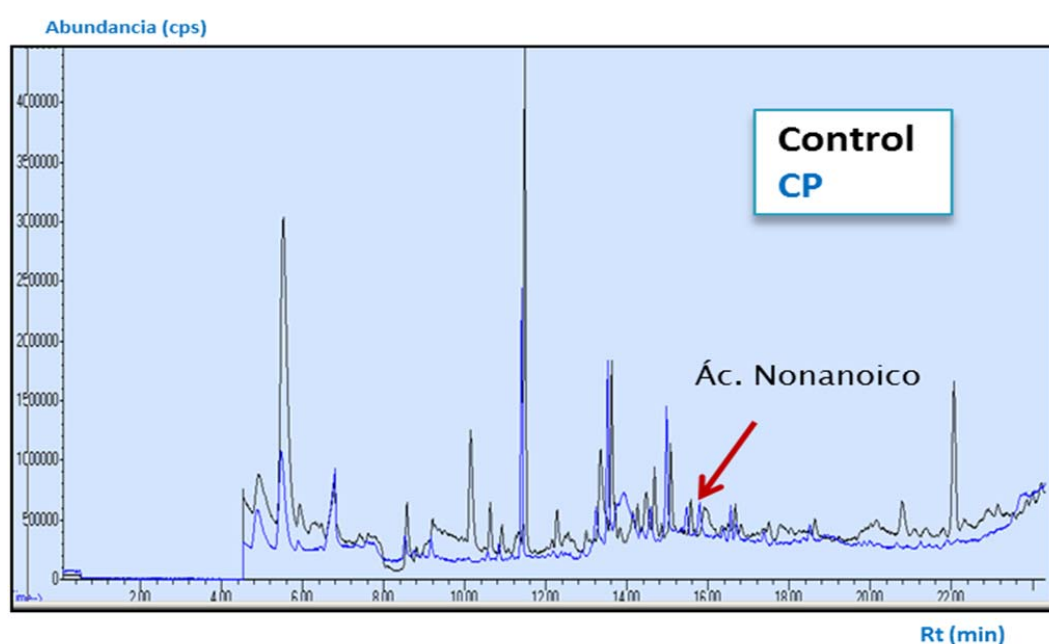


Figura 47. Cromatogramas grupo control y CP.

En la figura 47 se muestran los TIC correspondientes a grupo CP (azul) y control (negro). Se indica el pico en el minuto 15.9 en el TIC de CP, correspondiente al ácido nonanoico. Este pico no aparece en el TIC del control.

Estudio del grupo CP frente al grupo EPOC

A continuación hemos comparado el grupo CP con el grupo EPOC.

- i. Los datos del estudio cuantitativo quedan recogidos en la tabla 37. Tras aplicar el test de U de Mann-Whitney, sólo se observan diferencias estadísticamente significativas en el **ácido nonanoico** con una $p=0.001$.

Tabla 37. Comparación de VOC entre los grupos EPOC y CP. Valores de p^* basados en el test de U de Mann-Whitney.

	EPOC vs CP
Hexanal	0.098
Heptanal	0.851
Octanal	0.759
Nonanal	0.645
Ácido propanoico	0.533
Ácido nonanoico	0.001

*Test U de Mann-Whitney

- ii. Los datos del estudio cualitativo se recogen en la tabla 38. Los valores de OR para estudio de detección/no detección muestran que el único compuesto que presenta diferencias estadísticamente significativas es el ácido nonanoico.

Tabla 38. Relación entre la presencia de VOC en el grupo de cáncer frente al grupo EPOC. OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística.

	EPOC	CP	Valor de p
Hexanal	1.00	0.43 (0.18-1.04)	0.062
Heptanal	1.00	0.88 (0.41 – 1.91)	0.752
Octanal	1.00	0.10(0.36 – 3.41)	0.869
Nonanal	1.00	1.08(0.0– 2.32)	0.839
Ácido propanoico	1.00	1.08(0.50 – 2.32)	0.853
Ácido nonanoico	1.00	8.99 (2.01 – 40.1)	0.004

*OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística

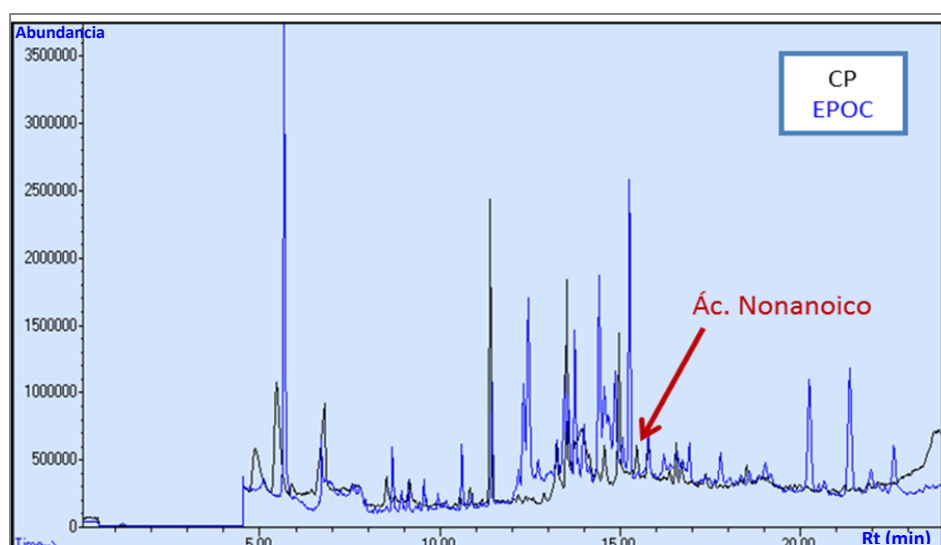


Figura 48. TIC correspondientes a grupo CP (negro) y EPOC (azul). Se señala el pico en el minuto 15.9 en el TIC de CP, correspondiente al ácido nonanoico. Este pico no aparece en el TIC de EPOC.

Estudio del grupo CP frente a grupos no tumorales (control+ EPOC)

Asumiendo el comportamiento semejante de los grupos EPOC y control tal como se refirió en el apartado de resultados 5.3.2, al no presentar diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los VOC analizados, ambos grupos se unificaron para su comparación frente al grupo CP. De nuevo resultó una diferencia significativa de los valores del **ácido nonanoico** tanto en el estudio cuantitativo (test de U-Mann-Whitney) como en el cualitativo (OR basado en regresión logística) ($p < 0.001$ y $p = 0.001$), (tablas 39 y 40 respectivamente).

Tabla 39. Comparación de VOC entre los grupos CP y No CP (Controles+EPOC). Valores de p* basados en el test de U de Mann-Whitney.

	(Control +EPOC) Vs CP
Hexanal	0.139
Heptanal	0.497
Octanal	0.923
Nonanal	0.458
Ácido propanoico	0.842
Ácido nonanoico	<0.001

* Test U de Mann-Whitney

Tabla 40. Relación entre la presencia de VOC en el grupo CP frente a no CP (grupo Control + grupo EPOC). OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística.

	Controles + EPOC	CP	Valor de p*
Hexanal	1.00	0.57 (0.29 – 1.10)	0.093
Heptanal	1.00	1.26 (0.72 – 2.22)	0.415
Octanal	1.00	0.96 (0.46 – 2.00)	0.920
Nonanal	1.00	1.34(0.77 – 2.33)	0.308
Ácido propanoico	1.00	1.19(0.68 – 2.09)	0.548
Ácido nonanoico	1.00	3.11(1.56 – 6.22)	0.001

* OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística

Comportamiento de los VOC en pacientes con CP fumadores frente a CP no fumadores.

A continuación vamos a estudiar cómo afecta el tabaquismo en la determinación de VOC dentro del grupo CP. En la tabla 41 quedan reflejados los datos de la comparación de medianas dentro del grupo CP al enfrentar pacientes con hábito tabáquico frente a pacientes no fumadores. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los dos subgrupos (**fumadores con CP frente a no fumadores con CP**).

Tabla 41. Mediana⁽ⁱ⁾ de cada uno de los VOC para el grupo CP y valor de p* que evalúa la diferencia entre ellos

	Mediana		P*
	No fumadores=9	Fumadores y Exfumadores=72	
Hexanal	0.095	0.095	0.957
Heptanal	0.145	0.055	0.536
Octanal	0.075	0.075	0.758
Nonanal	2.720	0.0160	0.564
Ácido propanoico	0.105	1.245	0.331
Ácido nonanoico	0.135	0.135	0.807

*Test U de Mann-Whitney

⁽ⁱ⁾Valores adimensionales calculados mediante la fórmula $(ABC_{VOC}) / (ABC_{Siloxano}) \times 100$, donde ABC : área bajo la curva del ion cuantificador medido en cps para cada VOC y Siloxano que es utilizado como compuesto de referencia interno.

Grupo cáncer de pulmón: con EPOC vs sin EPOC

La asociación de CP y EPOC es muy frecuente y, en nuestra muestra, el 70% de los casos de CP presentan la asociación de CP más EPOC. Dividimos el grupo cáncer de pulmón en 2 subgrupos: con EPOC y sin EPOC, y los comparamos entre ellos y, también, con los grupos control y EPOC, según el siguiente orden:

- CP con EPOC frente al grupo control
- CP EPOC frente a grupo EPOC
- CP sin EPOC frente al grupo control
- CP sin EPOC frente al grupo EPOC
- y finalmente CP con EPOC frente a CP sin EPOC.

Y realizamos estudios cuantitativo y cualitativo.

➤ Estudios cuantitativos

Los datos cuantitativos obtenidos se muestran en la tabla 42, donde se puede observar que el **ácido nonanoico** es el único VOC que muestra diferencias estadísticamente significativas cuando se compara el grupo cáncer, tenga o no asociado EPOC, con el grupo control y con el grupo EPOC.

Aunque el grupo **CP sin EPOC** frente a controles no muestre significación estadística, está próximo a ella, por lo que marca una tendencia ($p=0.006$).

Existen diferencias estadísticamente significativas en el **ácido propanoico** cuando se comparan los subgrupos **CP sin EPOC** frente a **CP con EPOC**. Finalmente, el **ácido propanoico** también presenta diferencias estadísticamente significativas al comparar el **grupo CP sin EPOC** frente al **grupo EPOC**.

Revisando los datos cuantitativos no se ha detectado ácido propanoico en el 85% de los casos del **subgrupo CP sin EPOC**. La mayor parte de este subgrupo corresponde a pacientes no fumadores con adenocarcinoma.

Tabla 42. Comparación de marcadores entre los diferentes grupos, diferenciando CP con EPOC y CP sin EPOC. Valores de p basados en el test de U de Mann Whitney.

	CP con EPOC Vs Control	CP con EPOC Vs EPOC	CP sin EPOC Vs Control	CP sin EPOC Vs EPOC	CP con EPOC Vs CP sin EPOC
Hexanal	0.180	0.068	0.918	0.516	0.426
Heptanal	0.728	0.051	0.092	0.469	0.231
Octanal	0.289	0.710	0.296	0.190	0.077
Nonanal	0.690	0.807	0.322	0.488	0.585
Ácido propanoico	0.085	0.802	0.091	0.033	0.005
Ácido nonanoico	0.024	0.001	0.060	0.044	0.935

*Test de U de Mann Whitney.

➤ Estudio cualitativo

En cuanto al estudio cualitativo, entre el **subgrupo de CP sin EPOC** y el **subgrupo de CP con EPOC**, solamente el ácido propanoico muestra diferencias significativas con una OR de 4.71 y $p=0.003$ (tabla 43).

Tabla 43. Relación entre la presencia de alguna cantidad cuantificable de VOC y la presencia de EPOC frente al grupo control. OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística.

	CP sin EPOC	CP con EPOC	Valor de p*
Hexanal	1.00	0.49 (0.15 - 1.61)	0.239
Heptanal	1.00	0.54 (0.21 - 1.42)	0.213
Octanal	1.00	0.45(0.12 - 1.64)	0.224
Nonanal	1.00	0.57 (0.22 - 1.50)	0.256
Ácido propanoico	1.00	4.71 (1.70 - 13.10)	0.003
Ácido nonanoico	1.00	0.92 (0.33 - 2.55)	0.877

*OR e intervalo de confianza al 95% basado en la regresión logística

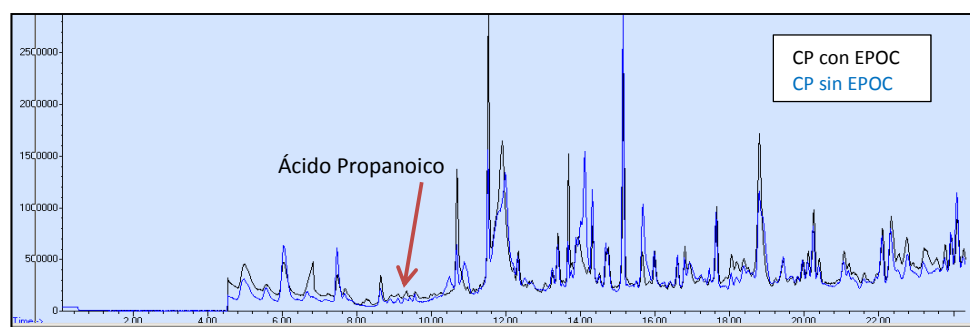


Figura 49. TIC de CP con EPOC y CP sin EPOC

En la figura 49 se muestran los TIC correspondientes a CP con EPOC (negro) y CP sin EPOC (azul). Se señala el pico en el minuto 9.2 en el TIC de CP con EPOC, correspondiente al ácido propanoico. Este pico no aparece en el TIC de CP sin EPOC.

Resumiendo lo anterior, el ácido nonanoico presenta diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos **CP con EPOC** frente a **controles** o **EPOC**, mientras que el ácido propanoico presenta diferencias estadísticamente significativas cuando se compara el subgrupo **CP sin EPOC** frente a **controles**, **EPOC** y **CP con EPOC**.

5.3.4. Sensibilidad y especificidad del ácido nonanoico y ácido propanoico en cáncer de pulmón

➤ Ácido nonanoico y cáncer de pulmón:

Con los datos anteriormente expuestos, al no encontrar diferencias en ninguno de los VOC estudiados entre los grupos Control y EPOC, se decide unificar ambos grupos y compararlos frente al grupo cáncer, de tal forma que obtendríamos dos grupos de estudio, uno sin enfermedad tumoral y otro con enfermedad tumoral.

Se estudia la sensibilidad y especificidad del ácido nonanoico como marcador de cáncer de pulmón. Los datos obtenidos se recogen en las siguientes tablas:

Al 95% de nivel de confianza, el **ácido nonanoico** está presente en 26 de los pacientes con CP y en 16 de las personas sin enfermedad tumoral.

Tabla 44. Validez como prueba diagnóstica del ácido nonanoico para CP

Prueba diagnóstica	Cáncer	Control + EPOC	Total
Positivo	26 (32.1%)	16 (12.4%)	42 (20%)
Negativo	55(67.9%)	113 (87,6%)	168 (80%)
Total	81	129	210

Tabla 45. Resultados de los parámetros de validez del ácido nonanoico como prueba diagnóstica para CP

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	32.10	21.31	42.88
Especificidad (%)	87.6	81.52	93.67
Índice de validez (%)	66.19	59.55	72.83
Valor predictivo + (%)	61.90	46.03	77.78
Valor predictivo - (%)	67.26	59.87	74.66
Prevalencia (%)	38.57	31.75	45.39
Índice de Youden	0.20	0.08	0.31
Razón de verosimilitud +	2.59	1.48	4.52
Razón de verosimilitud -	0.78	0.66	0.91

Los pacientes en los que se detecta ácido nonanoico tienen **3,11 veces más riesgo** (IC95%: 1,6 a 6,2) de manifestar CP que en los que no se detecta ($p=0,001$).

La *sensibilidad* del ácido nonanoico como marcador de CP es de 32%, y la *especificidad* del 87.6%, un *VPP* del 62% y un *VPN* del 67%.

➤ Ácido propanoico en pacientes con CP sin EPOC

En el CP **con EPOC**, el ácido propanoico se detecta en el 70% de los casos. La determinación de ácido propanoico no muestra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de CP con EPOC y los grupos EPOC o control individualmente.

En el 85% de los casos del subgrupo de **CP sin EPOC** no se ha detectado ácido propanoico. Cuando se comparan los grupos **CP con EPOC** y **CP sin EPOC**, este hallazgo muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos.

El **subgrupo de CP sin EPOC** se relaciona con la no detección del ácido propanoico con una sensibilidad del 66.7% ,especificidad del 70,18%, un VPP de 48,5% y un VPN de 83% (tablas 46 y 47).

Tabla 46. Validez como prueba diagnóstica del ácido propanoico para CP sin EPOC.

Prueba diagnóstica	CP sin EPOC	CP con EPOC	Total
Positivo	40 (70.2%)	8 (33.3%)	48 (59.3%)
Negativo	17 (29.8%)	16 (66.7%)	33 (40.7%)
Total	57	24	81

Tabla 47. Resultados de los parámetros de validez del ácido propanoico como prueba diagnóstica para CP sin EPOC.

	Valor	IC (95%)	
Sensibilidad (%)	70.18	57.42	82.93
Especificidad (%)	66.67	45.72	87.61
Índice de validez (%)	69.14	58.46	79.81
Valor predictivo + (%)	83.33	71.75	94.92
Valor predictivo - (%)	48.48	29.92	67.05
Prevalencia (%)	70.37	59.81	80.93
Índice de Youden	0.37	0.15	0.59
Razón de verosimilitud +	2.11	1.17	3.80
Razón de verosimilitud -	0.45	0.27	0.73

DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

El trabajo aquí presentado trata de establecer diferencias entre los compuestos exhalados en tres poblaciones bien diferenciadas como son un grupo control, clínicamente sano, un grupo EPOC y un grupo diagnosticado de CP. Para ello se ha desarrollado un método analítico que nos permitiese determinar los compuestos descritos anteriormente en el apartado 4.2.3.

Existen numerosos trabajos publicados en esta línea pero con gran diversidad en cuanto a características de la población de estudio, la recogida y tratamiento de la muestra, metodología analítica y búsqueda y hallazgos de posibles marcadores.

Hasta el momento no existe consenso alguno en ninguno de estos aspectos, si bien, la determinación de unos compuestos u otros va a estar condicionado, en gran medida, al tratamiento de la muestra antes de procesarla.

6.1. Metodología analítica

6.1.1. Recogida de la muestra

Una de las grandes problemáticas que encontramos en todos los estudios sobre VOC es la metodología, ya que la mayoría de los VOC son excretados en concentración nanomolar (10^{-9}) o picomolar (10^{-12}), lo que exige un método de trabajo especial, incluyendo la recogida y conservación de muestras. Revisando la bibliografía no existe un

acuerdo unánime sobre la recogida de la muestra, siendo este punto lo que va a marcar la diferencia de los resultados obtenidos en los estudios publicados.

Para la obtención de la muestra se han empleado las cámaras BioVOC®, tal como se refiere en el apartado material y métodos, buscando siempre recoger el mismo volumen de aire representativo de la fracción alveolar, evitando en lo posible la dispersión en el origen de la muestra y facilitando la repetición del estudio. Además, el que estos dispositivos sean reutilizables, ha mejorado la economía y la sostenibilidad del estudio.

Gordon *et al.*⁸⁹ y O'Neill *et al.*⁹¹, pertenecientes al mismo grupo de investigación, diseñaron un dispositivo propio para la recolección del aire, utilizando colectores para cromatografía de gases rellenos de Tenax (retienen compuestos desde **c6** – **c30**) y que se analizaban por desorción térmica utilizando He como gas portador y N₂ para condensar la muestra en la trampa fría, antes de la inyección al cromatógrafo de gases (figura 9). Esta metodología es incapaz de retener compuestos con un número inferior a 6 átomos de carbono, por lo que se pierden forzosamente muchos compuestos.

Phillips *et al.*^{66,67,92,93,96,97} utilizan un dispositivo de diseño propio para la recogida del aire alveolar (figura 11), eliminando en lo posible, los contaminantes procedentes del ambiente y del espacio muerto anatómico. El aire es recogido en trampas rellenas de dos adsorbentes y que posteriormente son analizadas tras la desorción térmica.

Otros como Van Berkel *et al.*¹¹⁹, Song *et al.*¹⁰⁷ o Kischkel *et al.*¹⁰⁵ utilizan bolsas tedlar® que permiten el almacenaje del aire exhalado en su totalidad, conteniendo la fracción correspondiente al espacio muerto anatómico. El empleo de estos dispositivos

tiene el inconveniente en que la fracción alveolar queda muy diluida y que existe mayor concentración de contaminantes que provienen del exterior.

Poli *et al.*^{94,106}, Fuch *et al.*¹⁰⁴, Jareño *et al.*¹¹⁵, por ejemplo, han recurrido a la utilización de los dispositivos comerciales BioVOC® Breath Sampler (Markes Int.TM) (figura 12), fácil de utilizar y que requiere una maniobra de espiración forzada. Son cámaras de teflón que permiten el paso del aire correspondiente al espacio muerto anatómico, quedando recogida en la cámara la fracción que corresponde al final de la capacidad vital forzada, buscando la máxima representación del aire alveolar. Aunque esto no deja de ser una aproximación, su fácil manejo y su reducido tamaño y peso favorecen su empleo. Kwak J *et al.*¹²⁶ evaluaron el empleo de los BioVOC para el análisis del aire exhalado. Recomendaron su uso únicamente para la detección de VOC presentes en altas concentraciones, a menos que se llevasen a cabo repetidas colecciones de muestras de aire y almacenadas en un mismo tubo de desorción, tal y como se ha hecho en este estudio.

6.1.2. Almacenaje de la muestra

Tampoco existe unanimidad en cuanto a la forma de almacenar la muestra previa al análisis. Gordon *et al.*⁸⁹, O'Neill *et al.*⁹¹ y Phillips *et al.*^{66,67,92,93,96,97} analizaban directamente la muestra de aire, obviando su almacenamiento. Sin embargo, la mayor parte de los autores utilizan distintos consumibles para el almacenaje de la muestra, sin haber llegado a acuerdo sobre su idoneidad, lo que plantea un nuevo problema en la determinación de los compuestos.

La mayoría de los autores se decantan por la utilización de fibras de microextracción en fase sólida (SPME) con posterior derivatización para la estabilización de compuestos inestables. Las fibras SPME permiten la adsorción de volátiles pero no de agua, lo que supone una gran ventaja. Además, la sensibilidad y especificidad mostradas son muy elevadas, pero se limitan a determinados grupos químicos funcionales. Es decir, focalizan sobre un grupo obviando el resto de volátiles. Esto que “*a priori*” puede suponer una ventaja pues la muestra está libre de agua y “purificada” de otros compuestos, obliga a repetir la recogida de muestras en el caso de buscar otro tipo de compuestos, dado que, hasta el momento, no hay acuerdo sobre qué familia/s de compuestos hay que dirigir la búsqueda. Además requieren de manipulación de la muestra para garantizar la estabilidad de determinados compuestos (aldehídos, por ejemplo).

Otra de las opciones utilizadas es el empleo de tubos de desorción térmica rellenos de distintos adsorbentes en función del tipo de compuesto que se quiera retener. En nuestro estudio se han empleado tubos de acero inoxidable universales (*Universal TO/17/2 de Markes®*) rellenos de tres materiales diferentes (Tenax TA + Graphitised Carbon Black + Carbonised Molecular Sieve) que permiten retener compuestos desde C3 a C20 y que quedan sellados con tapones DiffLok. Curiosamente esta técnica de sencillo manejo y que no requiere manipulación de la muestra, apenas ha sido empleada, y únicamente conocemos su utilización por Robroeks *et al.*¹²⁷, Sponring *et al.*¹²⁸ y Phillips C *et al.*¹²².

El mayor inconveniente que tiene el empleo de tubos de desorción es la gran cantidad de agua que queda retenida en los tubos, procedente del aire alveolar. Dado que

el agua es una sustancia incompatible con la cromatografía de gases, la mayoría de los investigadores ha prescindido de su empleo. Sin embargo, el empleo de los tubos de desorción universales una vez eliminado el problema del agua, nos permitiría el reprocesamiento de la muestra, una vez analizada, en busca de nuevos marcadores.

6.1.3. Técnicas analíticas

En cuanto a las técnicas analíticas, existe una gran diversidad de técnicas empleadas en el análisis del aire exhalado. Estudios como el de Wehinger *et al.*¹²⁹ o Bajtarerevic A *et al.*¹¹⁰ utilizaron un reactor de transferencia de protones (PTR) asociado a un espectrómetro de masas. Fens *et al.*¹²⁰ y Basanta *et al.*¹²¹ utilizaron un equipo de cromatografía de gases acoplados a un espectrómetro de masas en tándem Q-TOF (Q: cuadrupolo; TOF: “Time of flight”), que permite mejorar la identificación de los compuestos y la sensibilidad de la técnica, llegando a detectar concentraciones mucho más pequeñas e incluso obtener masas exactas, que utilizando espectrómetro de masas cuadrupolo simple; o métodos colorimétricos como el estudio de Mazzone *et al.*¹³⁰, o el empleo de la nariz electrónica por investigadores como Machado *et al.*⁶⁴, Di Natale C *et al.*⁶⁵, Dragonieri S *et al.*⁶³, y Gendron KB *et al.*¹³¹. Todos estos son ejemplos de variantes de la técnica analítica empleada en el análisis del aire exhalado.

La tecnología que ha sido empleada por la mayor parte de los estudios de VOC en aire exhalado que se han realizado ha sido la cromatografía de gases y espectrometría de masas utilizando un detector de masas con un cuadrupolo simple con ionización mediante impacto electrónico, que ha permitido la separación e identificación de los compuestos.

6.2. Desarrollo del método analítico

6.2.1. Obtención de la muestra. El problema del agua en el aire alveolar

Debido a la baja concentración a la que se encuentran la mayor parte de los VOC que parecen ser de interés y que no son contaminantes ambientales, el empleo de tubos de desorción requiere mayor cantidad de muestra de aire exhalado. Para la concentración de los compuestos hemos optado por repetir la maniobra de espiración forzada en tres ocasiones. De esta manera, el volumen final analizado es de 900ml, similar al analizado por Phillips M *et al.*^{66,67}, suficiente para la determinación de los VOC. Este procedimiento ha sido recomendado posteriormente por Kwak J *et al.*¹²⁶. Este método también fue parcialmente utilizado también por Phillips C *et al.*¹²² con la única diferencia de recolectar el aire en 3 tubos en vez de en uno.

El problema de requerir mayor cantidad de aire exhalado es que también aumenta la concentración de agua retenida en los tubos de desorción. Su eliminación parcial, de tal manera que la muestra sea compatible con la técnica analítica, ha supuesto un reto.

Su solución se ha desarrollado en dos etapas del método analítico, tal y como se describe en el apartado de material y métodos y que recordamos a continuación:

- Etapa de condensación en la trampa fría previa a la inyección a la columna cromatográfica.
- Final de la columna cromatográfica y antes de la entrada al espectrómetro de masas, con la instalación de una válvula de división de flujo.

6.2.2. Selección de compuestos

Desde el comienzo nos enfrentamos a varios problemas: El primero fue la dificultad de diferenciar dos compuestos químicamente muy diferentes, **butano y acetona**, pero con la misma masa y por tanto con espectro de masas similares. Para resolver este problema diseñamos un método específico para la separación de hidrocarburos (alcanos e hidrocarburos aromáticos) de bajo peso molecular. Una vez validado el método procedimos al análisis de las muestras obtenidas de pacientes con CP y de los controles así como del aire ambiental para cada una de las muestras de pacientes recogidas.

Entre los resultados obtenidos sorprendía, primero, la ausencia de detección de varios compuestos descritos por Phillips⁶⁷ y Poli⁹⁴ (butano y pentano), en segundo lugar, que era imposible diferenciar los isómeros estructurales (ej: los C11 o los C14) y, finalmente, que los compuestos aromáticos eran de procedencia exógena siendo su concentración mayor en el aire ambiental que en la muestra de aire exhalado, a pesar de lo cual eran considerados como marcadores por los autores citados.

Por todo ello y coincidiendo con una revisión de Buszewski B *et al.*⁹⁸ en la que se cuestionaban los compuestos descritos por Phillips⁶⁷ y Poli⁹⁴ como biomarcadores al no poder explicar su origen metabólico, replanteamos el método analítico hacia uno más general.

Dado que los VOC no sólo tienen un origen sistémico sino también pueden ser exógenos, procedentes del aire ambiental o del humo del tabaco, discriminar los compuestos de procedencia endógena de los de procedencia exógena es fundamental

para este tipo de estudios, en los cuáles la recogida y tratamiento de la muestra previa al análisis cobra una gran relevancia

Se han propuesto diversas metodologías al respecto. Phillips M *et al.*^{66,67,96} proponen un sencillo cálculo matemático restando a las concentraciones normalizadas de los VOC detectados en aire exhalado, las concentraciones determinadas en aire ambiente. Esta aproximación ha sido cuestionada al no explicar la complejidad de la absorción pulmonar de los compuestos exógenos y la exhalación posterior tras el metabolismo de los mismos en forma de diferentes VOC^{98,99,114}. Otro método propuesto fue mantener a la persona respirando aire puro, libre de VOC ambientales, durante un periodo de tiempo entre 4 y 30 minutos antes de la toma de la muestra¹³². Aun considerándose un buen método, no ha sido seguido en la mayor parte de los trabajos por su complejidad logística.

Para diferenciar compuestos exógenos de endógenos, recogimos de forma paralela una muestra de aire exhalado y otra de aire ambiental, comparando ambas. En lugar del método de aproximación descrito por Phillips *et al.*^{66,67,96} se procedió a normalizar las concentraciones con respecto a un patrón interno conocido, que se utiliza como factor de corrección de la variabilidad del proceso de desorción de los tubos. Se asumió como compuesto endógeno aquél cuya relación exhalado/ambiental fue mayor a 1, ya que nos aportaba la *seguridad* de tratarse de un compuesto de origen endógeno.

Una de las grandes problemáticas que existe actualmente es qué compuestos se pueden utilizar como marcadores y cuáles no. Existe una gran diversidad de compuestos descritos en la bibliografía, que van desde alcanos, hidrocarburos aromáticos, otros

hidrocarburos, alcoholes, compuestos carbonílicos y ácidos carboxílicos, y otras muchas familias de compuestos. Estudios como los de Phillips *et al.*^{66,67} y Poli *et al.*⁹⁴ que mostraban una elevadísima sensibilidad y especificidad utilizando combinaciones de diferentes hidrocarburos, fueron posteriormente criticados al no poder explicar cuál era su origen metabólico y por incluir en sus modelos compuestos que provienen de la contaminación ambiental o del humo del tabaco, y que fueron propuestos como marcadores de cáncer de pulmón, según se recoge en la publicación de Horvath⁹⁹ que desarrolla un análisis crítico de los resultados de los autores citados en el mismo sentido.

En 2010, Kischkel *et al.*¹⁰⁵ publica un trabajo muy interesante para CP. Tras la determinación de VOC, analiza los resultados mediante 5 algoritmos estadísticos diferentes, encontrando que la combinación de 14 VOC era suficiente para discriminar pacientes con CP de personas sanas. Aunque el trabajo tiene puntos a discutir, lo interesante de él es la justificación de los VOC incluidos en el modelo predictivo, justificando cada uno de los compuestos. El que existan compuestos que muestren significación estadística no es suficiente para la inclusión de éstos como biomarcadores. La identificación de biomarcadores ha de estar bien fundada, para que la normalización y el procesamiento de datos proporcionen información clínica relevante.

Actualmente adquiere gran relevancia el estudio de compuestos oxigenados al ser el resultado de procesos de peroxidación de los componentes celulares, entre éstos, los aldehídos y ácidos carboxílicos. Los primeros son referenciados por diversos autores como posibles marcadores de estrés oxidativo^{104,106,115,117,121,133}.

Nuestro estudio se ha centrado en aldehídos y en ácidos carboxílicos (tal como se describe en los apartados de Introducción y en Material y Métodos), en base a la elevada frecuencia de aparición de estos dos grupos de compuestos en múltiples determinaciones llevadas a cabo previamente^{134,135,136}. Estos compuestos tienen un origen conocido, pues son metabolitos finales de procesos de peroxidación lipídica de los ácidos grasos que forman parte de las membranas celulares. Por ejemplo, hexanal, heptanal y nonanal proceden de la oxidación de los ácidos grasos ω 3 y ω 6 (ácidos grasos poliinsaturados - ácido linoleico ω -6 y ácido linolénico ω -3), componentes principales de los fosfolípidos de membrana⁷⁷. En cuanto al ácido propanoico, proviene biológicamente de la escisión de ácidos grasos ω -3 o bien del metabolismo de algunos aminoácidos y el ácido nonanoico por escisión oxidativa de ácidos ω 9, por ejemplo, del ácido oleico.

Todos los resultados obtenidos en este trabajo son consecuencia de la metodología analítica empleada. A continuación se hace una discusión de los mismos en función de los grupos de estudio.

6.3. Estudio de los VOC en el grupo control

Se han evaluado las diferencias existentes en la concentración de los VOC del aire exhalado en función del consumo de tabaco en un grupo de estudio, formado exclusivamente por voluntarios sanos.

Según los resultados obtenidos, el único compuesto relacionado con el tabaco es el **nonanal** (tablas 26, 27 y 28). Su origen biológico es conocido y este resultado se apoya en que el tabaco provoca estrés oxidativo, lo que genera la destrucción de las células y la

aparición de los VOC, cuestión importante para su aplicación como marcador. El hallazgo de nonanal es independiente de la edad, género y cantidad de tabaco consumido, pero sí está relacionado con la cualidad de “*ser ó haber sido fumador*” ó “*no ser nunca fumador*”. Como dato importante, no se objetivó correlación cuantitativa entre tabaco consumido y nonanal exhalado. Estos hallazgos no se han encontrado en la bibliografía consultada. Es decir, la detección de nonanal se ve influida por la cualidad de ser o haber sido fumador, pero es independiente de la cantidad de tabaco consumido. Obliga a pensar en la persistencia de la lesión celular producida por el consumo de tabaco, que mantiene un estrés oxidativo elevado, aun cuando se haya abandonado el hábito de fumar mucho tiempo antes. El mantenimiento de esta alteración celular podría evolucionar a patología inflamatoria o tumoral, dependiendo del polimorfismo del citocromo P450 (CYP2E1, CYP1A1)⁹⁷, lo que debe ser motivo de estudios posteriores.

Revisando la bibliografía, la mayor parte de los estudios relacionados con VOC en aire exhalado están orientados hacia la búsqueda de marcadores que permitan diferenciar poblaciones con CP frente a otras no tumorales. En estos trabajos dividen los grupos de estudio en función del tabaquismo, agrupando por un lado fumadores activos y, por otro, exfumadores y no fumadores, o bien sin hacer referencia clara a su cualidad de fumador o exfumador. Aunque ha sido estudiada la determinación de VOC en fumadores, exfumadores y no fumadores del grupo control de muchos de estos trabajos, los resultados siempre vienen referidos a los hallazgos respecto a CP y EPOC^{67,94,137}, siendo muy escasas las publicaciones que comparan VOC en aire exhalado en fumadores y no

fumadores dentro de un grupo sano¹³⁸, y que permita valorar la importancia a la exposición del humo del tabaco como responsable del incremento del estrés oxidativo.

Huang *et al.*¹¹⁶ cuantifican a tiempo real aldehídos saturados (C3 a C10) en aire exhalado de voluntarios sanos, concluyendo que el propanal es el aldehído más abundante en el aire exhalado de voluntarios sanos. Sin embargo, los aldehídos de C4-C10 también están presentes pero en concentraciones muy pequeñas, inferiores a 3 ppbv. Emplazan a trabajos futuros la cuantificación de estos aldehídos en el aire exhalado de pacientes con una enfermedad de base, con el objetivo de poder establecer si aldehídos presentes en aire exhalado se pueden utilizar biomarcadores para fines diagnósticos.

6.4. Comparación del grupo EPOC frente al grupo control

En la comparación de los resultados obtenidos del grupo EPOC frente al grupo control, no hemos encontrado ningún compuesto que muestre diferencias estadísticamente significativas (tablas 31 y 32).

De los estudios publicados al respecto, nuestros datos sólo serían comparables con los resultados obtenidos por Phillips C *et al.*¹²² que utilizan una metodología similar a la nuestra. Aunque este grupo concluye que únicamente el isopreno muestra diferencias estadísticamente significativas entre el grupo EPOC y el grupo control, nosotros no hemos estudiado este compuesto al ser una molécula relacionada con la síntesis del colesterol, con lo que difícilmente puede atribuirse su origen al estrés oxidativo por lo que este VOC puede resultar un factor de confusión.

Del resto de los estudios comentar que el estudio de Van Berkel *et al.*¹¹⁹ no

explican cuál es el origen de los VOC propuestos para su modelo. Además consideran como marcadores compuestos que son claramente exógenos, como el benzonitrilo o terpineol, junto con otros de procedencia incierta, tales como alcanos ramificados. Igualmente valoran como marcador el isopreno. Los autores citados emplazan a justificar la procedencia de estos compuestos a futuros trabajos, lo que supone la existencia de seria duda de los autores sobre la validez en la valoración de estos compuestos como marcadores.

En el trabajo de Fens *et al.*¹²⁰ correlacionan la eosinofilia y neutrofilia en esputo inducido con VOC de origen incierto y otros no identificados que se les caracterizan únicamente por su tiempo de retención, si bien, no parece lógico correlacionar compuestos no identificados con otros marcadores biológicos. Además proponen hidrocarburos (alcanos, aromáticos...) como marcadores. Como ya hemos descrito no se puede aceptar los compuestos procedentes del humo del tabaco o de contaminación ambiental como marcadores. Es lógico pensar que compuestos que provienen del humo del tabaco y puedan estar elevados en personas fumadoras sin que signifique su producción endógena. Si además, el consumo del tabaco está habitualmente incrementado en el grupo EPOC, las cantidades exhaladas de estos compuestos serán muy superiores que las encontradas en un grupo control no fumador, que lo único que inhalarán será el aire ambiental, que también puede contener estas sustancias pero más diluidas, y por tanto estarán en menor concentración. Por todo esto y dado que no son compuestos que genere el organismo, no deben ser utilizados como marcadores de ninguna patología, como se concluye en diferentes revisiones críticas^{98,99,105,114}.

Por último, en los estudios de nariz electrónica no se sabe qué es lo que se está determinando, siendo además estudios no reproducibles. Por otra parte, su utilización es complicada y requiere un proceso de aprendizaje laborioso a base de análisis de muestras y la aplicación de un complejo procesamiento matemático que “enseña” a la nariz a distinguir entre diferentes tipos de pacientes. Una vez finalizada la vida útil del dispositivo, hay que comenzar de cero, siendo necesario repetir las fases de aprendizaje y adecuación matemática referidas anteriormente. Esto, unido a la influencia en las variaciones de los contaminantes ambientales, hace que los resultados obtenidos no puedan ser reproducibles.

6.5. Comparación del grupo de cáncer de pulmón frente al resto de los grupos

En nuestro estudio, se han evaluado las diferencias existentes entre el grupo CP frente a los dos grupos anteriormente descritos (grupo EPOC y grupo control). En la mayor parte de los estudios publicados no se identifica un único compuesto como marcador, sino que son un conjunto de compuestos los que permiten diferenciar entre diferentes poblaciones de estudio. A diferencia con el resto de los estudios, hemos encontrado un único compuesto, **ácido nonanoico**, que presenta diferencias estadísticamente significativas entre el grupo CP y el resto de los grupos (EPOC y control), con una probabilidad de casi tres veces superior de encontrar este VOC en CP frente al grupo control (tabla 36), y de casi 9 frente al grupo EPOC (tabla 38). Este hallazgo es independiente del tabaco (tabla 41).

Es de especial relevancia que el ácido nonanoico (9 átomos de carbono con *estado de máxima oxidación*) se detecte más en pacientes con CP, mientras que el nonanal (mismo número de átomos de C pero *en estado de oxidación intermedio*) es el único compuesto que se ha descrito con diferencias significativas entre los fumadores y exfumadores de personas clínicamente sanas. Es decir, lo que marca la diferencia entre tumoral y no tumoral es el estado de máxima oxidación de una molécula con el mismo número de átomos de C (9 en total), en máximo estado de oxidación. Este compuesto hasta el momento no ha encontrado citado en ningún artículo revisado.

La baja sensibilidad de la prueba (32%), se debe en gran medida a la técnica instrumental utilizada. Sin embargo, aun utilizando esta técnica, la especificidad del ácido nonanoico para cáncer de pulmón es del 88%.

Revisando los artículos publicados para CP, existe una gran variedad de compuestos propuestos que presentan diferencias entre los grupos de sanos y de CP, según se muestra en la revisión realizada por Van de Kant en 2012. De nuevo se hace notar, como ya se ha reiterado a lo largo de este trabajo, que todos los estudios que incluyan compuestos de origen incierto o de contaminantes ambientales, deberían ponerse en cuestión

Actualmente adquiere gran relevancia el estudio de aldehídos como biomarcadores al ser el resultado de procesos de peroxidación de los componentes celulares. Estos compuestos han sido referenciados por diversos autores como

marcadores de CP^{104, 106} o incluso cáncer de mama¹⁰². Estos resultados hay que tomarlos con cautela pues constan de un número muy reducido de pacientes.

Otro dato a valorar es que inicialmente se cuestionaron los estudios realizados por Phillips *et al.*^{66,67} debido a la falta de inclusión el grupo EPOC para su comparación con el grupo CP. Pues bien, en esta revisión de todos ellos, únicamente los estudios realizados por Poli *et al.*⁹⁴ incluyen al grupo EPOC como grupo de estudio frente al grupo CP, siendo el cáncer una patología que se da altísima frecuencia en pacientes con EPOC, con fenotipo enfisema^{139,140}.

6.6. Comparación de subgrupos de cáncer de pulmón con EPOC y sin EPOC

El grupo CP es un grupo a tratar de forma especial. Coexisten diferentes factores que pueden dar lugar a interferencias o simplemente a confusión, como pueden ser la diferente histología tumoral, el tamaño del tumor, estadificación, existencia de historia de tabaquismo y, sobre todo, la asociación con EPOC.

Se ha dividido el grupo CP en dos, los que están asociados EPOC y los que no. Se ha demostrado en nuestro trabajo que el **ácido propanoico** muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Recordemos que entre los diferentes grupos (control, EPOC y CP), este ácido no mostraba diferencias, encontrándose en la mayor parte de las muestras analizadas, con una excepción: en el subgrupo de **cáncer de pulmón sin EPOC**, en el que no se ha detectado en el 85% de los casos. Este subgrupo, un tanto especial, engloba pacientes fumadores de poco índice tabáquico, así como, pacientes no fumadores, casi todos ellos mujeres con histología de adenocarcinoma.

No se han podido establecer diferencias entre fumadores y no fumadores dentro de este subgrupo por el escaso número de pacientes con los que contábamos.

La sensibilidad y especificidad de la prueba para el ácido propanoico son de 67% y 69% respectivamente.

Es necesario continuar el estudio ampliando el número de pacientes que permita una estratificación potente por TNM e histología.

CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

1. El ácido nonanoico discrimina entre el grupo CP y el resto de grupos, pudiendo considerarlo marcador de cáncer, con una especificidad del 87%.
2. La ausencia de ácido propanoico se asocia al subgrupo de *CP sin EPOC*. En el subgrupo de pacientes no fumadores y con histología de adenocarcinoma llega a ser del 100%.
3. El nonanal muestra significación estadística entre personas sanas con historia de tabaquismo (actual o previo) frente a personas sanas no fumadoras. Se relaciona con la cualidad de ser o haber sido fumador. Es independiente del género y de la cantidad de tabaco consumido.
4. No se ha encontrado ningún VOC que diferencie entre los grupos EPOC y Control.
5. Se ha puesto a punto un método analítico que permite determinar e identificar VOC en aire exhalado, pudiendo reprocesar con facilidad en busca de posibles nuevos marcadores. No obstante es insuficiente para la correcta reproducibilidad en la determinación de ácidos carboxílicos.
6. Es necesario un acuerdo de consenso para normalizar la recogida y procesamiento de las muestras de aire exhalado que permita la posible aplicación de los VOC como marcadores en la práctica clínica.

ANEXOS

8. ANEXOS

ANEXO 1

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

PROYECTO DE INVESTIGACION: *"Utilidad de los compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado en el diagnóstico y seguimiento evolutivo del cáncer broncogénico."*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Luis Callol Sánchez

Se solicita su participación en el siguiente proyecto de investigación cuyo objetivo principal es la determinación de diversos compuestos orgánicos volátiles (VOC) en aire exhalado como factor diagnóstico y predictivo del Cáncer de Pulmón y su posible recidiva tras tratamiento.

En este estudio participan el Hospital Central de la Defensa, Hospital Clínico San Carlos, Facultades de Medicina de Alcalá y UCM, Farmacia de la UCM, y San Pablo CEU, con un total de 800 participantes.

Participan sólo individuos que deciden tomar parte. Le rogamos que lea con detenimiento el presente documento. Haga preguntas acerca de cualquier cosa que no comprenda. Tómese su tiempo para tomar una decisión.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Durante la primera consulta se realizará una breve historia clínica. Los datos del estudio incluyen datos personales necesarios para el proceso y se analizarán y procesarán, pero sólo para fines de investigación relacionados con el presente estudio. Solamente se revisará la parte de historia clínica relevante al estudio. Los registros que contienen estos datos pueden ser enviados a otros países y publicados pero **no se le identificará por su nombre en ningún caso.**

Posteriormente se recogerá la muestra de aire exhalado mediante una maniobra de espiración forzada y se almacenará en tubos de *desorción térmica (tubos de acero rellenos de material adsorbente)* especiales debidamente etiquetados para su análisis en el día.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS Y BENEFICIOS DEL ESTUDIO?

Los riesgos que supone someterse a este estudio son mínimos y poco molestos. No habrá coste alguno por las consultas del médico relacionadas con el estudio ni por las pruebas realizadas.

CONFIDENCIALIDAD

Se mantendrá la confidencialidad de todos los datos recogidos concernientes al estudio de acuerdo con lo establecido en la Ley General de Sanidad, la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de Carácter Personal y la Ley 41/2002 de Autonomía del Paciente."

Entre las organizaciones que podrán inspeccionar los registros de investigación que le conciernen a fin de verificar la exactitud de dichos registros y para analizar los datos son:

- El promotor del estudio (servicio de Neumología del Hospital Central de la Defensa) así como el servicio de Medicina Preventiva.
- El Comité ético (un grupo de personas que revisan la investigación para proteger sus derechos), y
- Las administraciones sanitarias (Ministerio de Sanidad y Consumo de España, Comunidades Autónomas y aquellas internacionales a efectos exclusivamente científicos).

Todos estos grupos aceptan proteger la confidencialidad de los datos obtenidos de y acerca de usted durante el presente estudio.

¿CUÁLES SON MIS DERECHOS COMO PARTICIPANTE EN EL PRESENTE ESTUDIO?

La participación en el presente estudio es voluntaria. Puede usted decidir no participar o puede abandonar el estudio en cualquier momento. La decisión de no participar o de abandonar el estudio no ocasionará ninguna penalización ni coste alguno.

Le comunicaremos cualquier nueva información que pueda afectar a su salud.

¿A QUIÉN LLAMO SI TENGO PREGUNTAS O PROBLEMAS?

Para formular preguntas acerca del estudio póngase en contacto con un médico o con un miembro del personal investigador.

Estas personas estarán disponibles para responder a sus preguntas antes, durante y después del estudio.

HOJA DE FIRMAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____
(Nombre del paciente en mayúsculas y D.N. I.)

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- He recibido una copia de este documento.
- Consiento que personal del Servicio de Neumología encargado del estudio pueda revisar mi historial médico personal para verificar la fidelidad de los datos durante el éste.

He hablado con: _____
(Nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera.
- Sin tener que dar explicaciones.
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

FECHA


FIRMA DEL PARTICIPANTE

FECHA

FIRMA DEL INVESTIGADOR

Nota: Cada persona debe firmar y fechar de su puño y letra.

ANEXO 2


HOSPITAL CENTRAL DE LA DEFENSA

Glorieta del Ejército, s/n
Teléf.: 91 422 80 00
28047 Madrid

INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D Ignacio Galicia de Pedro, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Central de la Defensa "Gómez Ulla"

CERTIFICA:

Que este Comité ha evaluado el proyecto de investigación:

TITULO: Utilidad de la determinación de compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado en el diagnóstico precoz de cáncer broncogénico.

PROMOTOR: Luis Callol Sánchez



INVESTIGADOR PRINCIPAL: Luis Callol Sánchez.

Y considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados el procedimiento para obtener el consentimiento informado, y el modo de reclutamiento previsto, así como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.

Y que este Comité **ACEPTA** que dicho estudio sea realizado en este hospital por el Dr. Luis Callol Sánchez como investigador principal.

Lo que firmo en Madrid, a 27 de Octubre de 2006



RS: IS-404030-S-06-000153

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Callol L., Gómez de Terreros FJ. Diagnóstico precoz del cáncer de pulmón. Arch. Bronconeumol. 1999; 35:395-403.
- ² Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC<http://globocan.iarc.fr/2012>.
- ³ <http://cne.isciii.es/2007>.
- ⁴ José Luis Álvarez-Sala Walther, Victoria Villena Garrido, Juan Luis Rodríguez Hermosa, Felipe Rodríguez de Castro , Pere Casan Clarà. Neumología Clínica.Madrid: Elsevier;2010.
- ⁵ Gullón JA, SuárezY, Medina A, Martín C, Cabrera E, González IJ. Carcinoma de pulmón: cambios en epidemiología y supervivencia. Rev Clin Esp. 2012; 212(1):18-23.
- ⁶ Sánchez De CosEscuín J. El cáncer de pulmón en España. Epidemiología, supervivencia y tratamiento actuales. Arch Bronconeumol. 2009; 45(7):341–348.
- ⁷ Isla D, Provencio M, Majem M; Felip E, Viñolas N, García R, et al. Never-smoking women with lung cancer from the Spanish WORLD07 database. J Clin Oncol. 2012; 30:93S.
- ⁸ Cantos B, Majem M, Garrido P, Viñolas N, Isla D, García-Campelo MR, et al. Menstrual status and lung cancer in female patients from the Spanish WORLD07 database. J Clin Oncol. 2012; 30(suppl; abstr e12012).
- ⁹ Morrow JD, Frei B. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. N Engl J Med. 1995; 332:1198-203.
- ¹⁰ Nisikawa M. Cigarette smoke-induced acute airway impairment. Nih Kok Gak Zas. 2000; 38(5):347-53.
- ¹¹ Carrión Valero F, Hernández JR. El tabaquismo pasivo en adultos. Archivos de Bronconeumología. 2001. 38(3):137-46.
- ¹² St John TM, Robinett FD. Lung cancer: building hope through comprehensive prevention. Cancer. 2000;89(11Suppl):2377-86.
- ¹³ <http://www.cancer.gov> 2013.
- ¹⁴ Callol L. Villegas F., De Granda I. Arias E. Diagnóstico del cáncer de pulmón. ¿Puede hacerse un diagnostico precoz? Rev Patol Respir. 2007; 10(1): 40-49.

-
- ¹⁵Callol L, Jareño J. ELCAP: Crónica de una historia anunciada. El futuro que llega. *Rev Patol Respir.* 2007; 10(1): 1-3.
- ¹⁶Callol L, Grupo cooperativo de DPCB. Utilidad de la tomografía axial computerizada en el diagnostico precoz de cáncer de pulmón. *Rev Patol Respir.* 2004; 7(1): 31-33.
- ¹⁷Mao L, Lee J, Kurie J, Fan Y, Lippman S, Lee J, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(12):857-62.
- ¹⁸Tseng JE, Rodríguez L, Ro J, Liu D, Hong WK, Mao L. Gender differences in p53 mutational status in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1999;59(22):5666-70.
- ¹⁹Notterman D, Young S, Wainger B, Levine AJ. Prevention of mammalian DNA reduplication, following the release from the mitotic spindle checkpoint, requires p53 protein, but not p53 mediated transcriptional activity. *Oncogene.* 1998;17(21):2743-51.
- ²⁰Sanz-Ortega J, Bryant B, Sanz-Esponera J, Asenjo JA, Saez MC, Torres A. LOH at the APC/MCC gene (5Q21) is frequent in early stages of non small cell lung cancer. *Pathol Res.* 1999;195(10):677-80.
- ²¹Tseng R, Chang J, Hsien F, Chang Y, Hsiao c, Chen J, et al. Genome wide loss heterozygosity and its clinical associations in non small cell lung cancer. *Int J Cancer.* 2005; 117(2):241-7.
- ²²Hussein MR, Woods GS. Building bridges in cancer – Mismatch repair and microsatellite instability. *Am J Dermopathol.* 2002;24(1):76-81.
- ²³Riese U, Dahse R, Fiedler W, Theuer C, Kosciensky S, Ernst G. Tumor supresor gene p16 (CDKN2A) mutation status and promoter inactivation in head and neck cancer. *Int J Mol Med.* 1999;4(1):61-5
- ²⁴Paez, J.G, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib. therapy. *Science* 2004;304:1497-1500.
- ²⁵Varela-García, M. Chromosomal and genomic changes in lung cáncer. *Cell Adhesión& Migration.* 2009; 4, 100-6.
- ²⁶Pao, W.; Girard, N. New driver mutations in non-small-cell lung cáncer. *Lancet Oncol.* 2011;12:175-80.
- ²⁷Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(25):2385-94.
- ²⁸Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK and Harris C Editors. Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Albany, NY (USA): WHO Publications Center; 2004.
-

-
- ²⁹Rami Porta R. Nueva clasificación TNM del cáncer de pulmón. Arch Bronconeumol. 2009;45(4):159-61.
- ³⁰Diccionario de la Lengua Española. 23ª ed. Madrid: Real Academia Española; 2014.
- ³¹Fontana RS, Sanderson DR, Miller WE, Woolner LB, Taylor WF, Uhlenhopp MA. The Mayo Lung Project: preliminary report of "early cancer detection" phase. Cancer. 1972;30(5):1373-82.
- ³²Kubic A, Parkin DM, Klat M, Erban J, Polak J, Ademec M. Lack of benefit from semi-annual screening for cancer of the lung: follow up report of a randomized controlled trial on a population of high risk males in Czechoslovakia. Int J Cancer. 1990; 45:26-33.
- ³³Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB, Taylor WF, Miller WE, Muhm JR, Bernartz PE, Payne WS, Pairolero PC, Bergstralh. Screening for lung cancer: A critique of the Mayo project. Cancer. 1991;67(4 Suppl):1155-64.
- ³⁴Black C, Bagust A, Boland A, Walker S, McLeod C, De Verteuil R, *et al.* The clinical effectiveness and cost-effectiveness of computed tomography screening for lung cancer: systematic reviews. Health Technol Assess. 2006;10(3):iii-iv, ix-x, 1-90.
- ³⁵National Cancer Institute (NCI). What is NLST?. Bethesda (MD): National Cancer Institute; 2008 Disponible en: www.cancer.gov/NLST.
- ³⁶Dominioni L, Strauss GM, Imperatori A, Rovera F, Dionigi G. Screening for lung cancer. Chest Surg Clin N Am. 2000;10(4):729-36.
- ³⁷Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, Libby DM, Pasmantier MW, Koizumi J, Altorki NK, Smith JP. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. Lancet. 1999;354:99-105.
- ³⁸Henschke CI, Naidich DP, Yankelevitz DF, McGuinness G, McCauley DI, Smith JP, *et al.* Early lung cancer action project: initial findings on repeat screenings. Cancer. 2001;92(1):153-9.
- ³⁹Swensen SJ, Jett JR, Sloan JA, Midthun DE, Hartman TE, Sykes AM, *et al.* Screening for lung cancer with low-dose spiral computed tomography. Am J Respir Crit Care Med. 2002; 165:508-513.
- ⁴⁰Nawa T, Nakagawa T, Kusano S, Kawasaki Y, Sugawara Y, Nakata H. Lung cancer screening using low-dose spiral CT: results of baseline and 1-year follow-up studies. Chest. 2002;122(1):15-20.
- ⁴¹Bastarrika G, Garcia-Velloso MJ, Lozano MD, Montes U, Torre W, Spiteri N, Campo A, Seijo L, Alcaide AB, Pueyo J, Cano D, Vivas I, Cosín O, Domínguez P, Serra P, Richter JA, Montuenga L, and Zulueta JJ. Early lung cancer detection using spiral computed

tomography and positron emission tomography. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(12):1378-83.

⁴²Callol L, Roig F, Cuevas A, De Granda JI, Villegas F, Jareño J, Arias E, Martinez-Albiach JM. Low-dose CT: A useful and accesible tool for the early diagnosis of lung cancer in selected populations. *Lung cancer*. 2007;56(2):217-21.

⁴³The Early Lung Cancer Action Program Investigators. Survival of patients with stage I Lung Cancer detected on CT screening. *N Engl J Med*. 2006; 355:1763-71.

⁴⁴Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias - avalia-t Núm. 2007/06

⁴⁵Humphrey LL, Teutsch S, Johnson M. Lung cancer screening with sputum cytologic examination, chest radiography, and computed tomography: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*. 2004;140(9):740-53.

⁴⁶Marcus PM, Bergstralh EJ, Zweig MH, Harris A, Offord KP, Fontana RS. Extended lung cancer incidence follow-up in the Mayo Lung Project and overdiagnosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(11):748-56.

⁴⁷Smith R, Cokkinides V, Brawley O. Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(1):27-41.

⁴⁸The National Lung Screening Trial Research Team. Reduced Lung-Cancer Mortality with Low-Dose Computed Tomographic Screening. *N Engl J Med*. 2011; 365:395-409.

⁴⁹Peter B. Bach; Joshua N. Mirkin; Thomas K. Oliver; *et al*. Benefits and harms of CT screening for lung cancer. *JAMA*. 2012;307(22):2418-29.

⁵⁰Pyenson BS, Sander MS, Jiang Y, Kahn H, and Mulshine JL. An actuarial analysis shows that offering lung cancer screening as an insurance benefit would save lives at relatively low cost. *Health Aff (Millwood)*. 2012;31(4):770-9.

⁵¹Nicholson JK, Lindon JC. Metabonomics. *Nature*. 2008;455:1054–6.

⁵²Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The Sequence of the Human Genome. *Sci*. 2001;291 (5507):1304–51.

⁵³Nicholson JK. Global systems biology, personalized medicine and molecular epidemiology. *Mol Syst Biol*. 2006; 3;2(1)

⁵⁴Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell*. 2008;134(5):714–7.

⁵⁵Aberle DR, Brown K. Lung cancer screening with CT. *Clin Chest Med*. 2008;29(1):1-14.

⁵⁶Melamed MR. Lung cancer screening results in the National Cancer Institute New York study. *Cancer*. 2000;89(11 Suppl):2356-62.

-
- ⁵⁷Sanz-Ortega J, Roig F, Al-Mousa MM, Saez MC, Muñoz A, Sanz-Esponera J, Callol L. 17p13 (p53 locus), 5q21 (APC locus) and 9p21 (p16 locus) allelic deletions are frequently found in oral exfoliative cytology cells from smoker patients with non small cell lung cancer. *Histol Histopathol*. 2007;22(5):541-5.
- ⁵⁸Roig F. Estudio de PDH en los genes p53, p16 y APC en cavidad oral. Marcadores de riesgo para cáncer de pulmón. 2011. Saarbrücken, Alemania. Editorial Académica Española.
- ⁵⁹Petricoin EF, Liotta LA. Clinical applications of proteomics. *J Nutr*. 2003;133(7 Suppl):2476S-84S.
- ⁶⁰Rahman SM, Shyr Y, Yildiz PB, Gonzalez AL, Li H, Zhang X, et al. Proteomic patterns of preinvasive bronchial lesions. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172(12):1556-62.
- ⁶¹Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, Alving K, Antczak A, Baraldi E, et al. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J*. 2005;26(3):523-48.
- ⁶²González-Mangado N. Análisis del condensado exhalado: ¿una técnica con futuro?. *Arch Bronconeumol*. 2005;41:540-1.
- ⁶³Dragonieri S, Annema JT, Schot R, van der Schee MP, Spanevello A, Carratú P, Resta O, Rabe KF, Sterk PJ. An electronic nose in the discrimination of patients with non-small cell lung cancer and COPD. *Lung Cancer*. 2009;64(2):166-70.
- ⁶⁴Machado RF, Laskowski D, Deffenderfer O, Burch T, Zheng S, Mazzone PJ, Mekhail T, Jennings C, Stoller JK, Pyle J, Duncan J, Dweik RA, Erzurum SC. Detection of lung cancer by sensor array analyses of exhaled breath. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(11):1286-91.
- ⁶⁵Di Natale C, Macagnano A, Martinelli E, Paolesse R, D'Arcangelo G, Roscioni C, Finazzi-Agrò A, D'Amico A. Lung cancer identification by the analysis of breath by means of an array of non-selective gas sensors. *Biosens Bioelectron*. 2003 Sep;18(10):1209-18, DOI: 10.1016/S0956-5663(03)00086-1.
- ⁶⁶Phillips M, Gleeson K, Hughes JM, Greenberg J, Cataneo RN, Baker L, McVay WP. Volatile organic compounds in breath as markers of lung cancer: a cross-sectional study. *Lancet*. 1999; 353: 1930-3.
- ⁶⁷Phillips M, Cataneo RN, Cummin AR, Gagliardi AJ, Gleeson K, Greenberg J, Maxfield RA, Rom WN. Detection of lung cancer with volatile markers in the breath. *Chest*. 2003;123:2115-23.
- ⁶⁸Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Cir Res* 2000;87(10):840-4.
- ⁶⁹Elejalde Guerra JI. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An*.
-

Med. Interna. 2001;18(6):326-35

⁷⁰ Ríos de Molina MC. El estrés oxidativo y el destino celular. Química Viva. 2003;2(1):17-28

⁷¹ Rodríguez Perón JM, Menéndez López JR, y Trujillo López Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cubana Med Milit. 2001;30(1):36-44.

⁷² Romero PV, Rodríguez B, Martínez S, Cañizares R, Sepúlveda D, Manresa F. Estrés Oxidativo en el condensado de pacientes con infección pulmonar grave. Arch. Bronconeumol. 2006;42(3):113-9.

⁷³ Barriero E. EPOC y Cáncer de pulmón. Arch. Bronconeumol. 2008;44(8):399-401.

⁷⁴ Barceló A, Barbé F. Estrés oxidativo y síndrome de apneas – hipoapneas del sueño. Arch. Bronconeumol. 2005;41(7):393-9.

⁷⁵ Loft S, Poulsen HE. Cancer risk and oxidative DNA damage in man. J. Mol. Med. 1996;74:297-312.

⁷⁶ Castillo Andreu E. Regulación por estrés oxidativo de la actividad del factor de transcripción Pap1 de *Schizo saccharomyces pombe*. Tesis Doctoral. Departament de Ciències Experimentals i de la Salut. Universitat Pompeu Fabra. Barcelona, 2005. ISBN: 84-689-5222-2.

⁷⁷ Kneepkens F, Lepage G, Roy C. The Potential of the hydrocarbon breath test as a measure of lipid peroxidation. Free Radical Biol.Med. 1994. 17(2): 127-160.

⁷⁸ Mac Nee W. Oxidants/Antioxidaants and COPD. Chest. 2000;117(5 Supl 1):303s-17s.

⁷⁹ Martín Ruiz A, Rodríguez Gómez I, Rubio C, Robert C, Hardisson A. Efectos tóxicos del tabaco. Rev. Toxicol. 2004; 21:64-71.

⁸⁰ Van Klaveren RJ, Nemery B. Role of reactive oxygen species in occupational and environmental obstructive pulmonary disease. Curr Opin Pulm Med. 1999;5(2):118-23.

⁸¹ Weisburger JH. Prevention of cancer and other chronic diseases worldwide based on sound mechanisms. Biofactors. 2000;12:73-81.

⁸² Orellana M. Cytochrome P450 activity and its alteration in different diseases Rev Méd Chile 2004; 132: 85-94.

⁸³ Scheller U, Zimmer T, Kärger E, Schunck WH. Characterization of the n-Alkane and Fatty Acid Hydroxylating Cytochrome P450 Forms 52A3 and 52A4. Arch. Biochem. Biophys. 1996; 328 (2): 245-254.

⁸⁴ Lin JH, Lu A. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. Clin Pharmacokinetic. 1998; 35:361-90.

-
- ⁸⁵ Fortuna A, Balleza M, Calaf N, González M, Feixaz T, Casan P. Determinación de la concentración de NO alveolar en aire espirado: procedimiento y valores de referencia en personas sanas. *Arch. Bronconeumol.* 2009;45(3):145-9.
- ⁸⁶ Lema JB, González M, Vigil L, Casan P. Condensado de aire espirado: estandarización de la recogida de muestras en voluntarios sanos. *Arch. Bronconeumol.* 2005;41(10):584-6.
- ⁸⁷ Kinter M. Analytical technologies for lipid oxidation products analysis. *J. Chromatogr B Biomed Appl.* 1995; 671(1-2):223-36.
- ⁸⁸ Pauling L, Robinson AB, Teranishi R, Cary P. Quantitative analysis of urine vapor and breath by gas-liquid partition chromatography. *Proc.Natl.Acad.Sci (USA).* 1971;68: 2374-6.
- ⁸⁹ Gordon SM, Szidon JP, Krotoszynski BK, Gibbons RD, O'Neill HJ. Volatile organic compounds in exhaled air from patients with lung cancer. *Clim Chem.* 1985;31(8): 1278-82.
- ⁹⁰ Preti G, Labows JN, Kostelc JG, Aldinger S, Daniele R. Analysis of lung air from patients with bronchogenic carcinoma and controls using gas chromatography – mass spectrometry. *J Chromatogr.* 1988;432:1-11
- ⁹¹ O'Neill HJ, Gordon SM, O'Neill MH, Gibbons RD, Szidon JP. A Computerized technique for screening for the presence of breath biomarkers in lung cancer. *ClinChem* 1988; 34:1613-18
- ⁹² Phillips M, Greenberg J, Awad J. Metabolic and enviromental origins of volátil organic compounds in breath. *JClinPathol.* 1994;47:1052-3
- ⁹³ Phillips M et al. Method for the collection and assay of volatile organic compounds in breath. *Anal Biochem.* 1997;247: 272-8
- ⁹⁴ Poli D, Carbognani P, Corradi M, Goldoni M, Acampa O, Balbi B, et al. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short follow-up study. *Respiratory Research.* 2005; 6(71): 1186-95.
- ⁹⁵ Chen X, Xu F, Wang Y, Pan Y, Lu D, Wang P, Ying K, Chen E, Zhang W. A Study of the Volatile Organic Compounds Exhaled by Lung Cancer Cells In Vitro for Breath Diagnosis. *Cancer.* 2007; 110:835–44.
- ⁹⁶ Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, Greenberg J, Kloss R, Maxfield RA, Munawar MI, Pass HI, Rashid A, Rom WN, Schmitt P. Prediction of lung cáncer using volatile biomarkers in breath. *Cancer Biomark.* 2007;3(2):95-109.
- ⁹⁷ Phillips M, Altorki N, Austin JH, Cameron RB, Cataneo RN, Kloss R, Maxfield RA, Munawar MI, Pass HI, Rashid A, Rom WN, Schmitt P, Wai J. Detection of lung cancer

using weighted digital analysis of breath biomarkers. *Clin Chim Acta*. 2008; 393(2):76–84.

⁹⁸Buszewski B, Keszy M, Ligor T, Amann A. Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomed.Chromatogr*. 2007;21:553–566.

⁹⁹Horváth I, Lázár Z, Gyulai N, Kollai M, Losonczy G. Exhaled biomarkers in lung cancer *Eur Respir J*. 2009;34(1):264-75.

¹⁰⁰Van de Kant K, van der Sande L, Jöbsis Q, van Schayck O and Dompeling E. Clinical use of exhaled volatile organic compounds in pulmonary diseases: a systematic review. *Respiratory Research* 2012;13:117-140.

¹⁰¹ Buszewski B, Ligor T, Jezierski T, Wenda-Piesik A, Walczak M, Rudnicka J: Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography–mass spectrometry: comparison with discrimination by canines. *Anal Bioanal Chem*. 2012; 404(1):141–6.

¹⁰² Rudnicka J, Kowalkowski T, Ligor T, Buszewski B: Determination of volatile organic compounds as biomarkers of lung cancer by SPME-GC-TOF/MS and chemometrics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011; 879(30):3360–6.

¹⁰³ Ulanowska A, Kowalkowski T, Trawinska E, Buszewski B: The application of statistical methods using VOCs to identify patients with lung cancer. *J Breath Res* 2011, 5(4):046008.

¹⁰⁴Fuch P, Loesken C, Shubert JK, Miekisch W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int. J. Cancer* 2010;126:2663-70

¹⁰⁵Kischkel S, Miekisch W, Sawacki A, Straker E, Trefz P, Amann A. et al. Breath biomarkers for lung cancer detection and assessment of smoking related effects – confounding variables, influence of normalization and statistical algorithms. *Clin Chim Acta*. 2010; 411: 1637-44.

¹⁰⁶Poli D, Goldoni M, Corradi M, Acampa O, Carbognani P, Internullo E, et al. Determination of aldehydes in exhaled breath of patients with lung cancer by means of on-fiber-derivatisation SPME® -GC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life* 2010.(27):2643-51

¹⁰⁷Song G, Qin T, Liu H, Xu GB, Pan YY, Xiong FX, et al. Quantitative breath analysis of volatile organic compounds of lung cancer patients. *Lung Cancer*.2010;67(2):227-31.

¹⁰⁸Ligor H, Ligor T, Bajtarevic A, Ager C, Pienz H, Klieber Met al. Determination of volatile organic compounds in exhaled breath of patients with lung cancer using solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med*. 2009; 47(5):550-60.

-
- ¹⁰⁹Gaspar EM, Lucena AF, Duro da Costa J, Chaves das Neves H: Organic metabolites in exhaled human breath—a multivariate approach for identification of biomarkers in lung disorders. *J Chromatogr A* 2009,1216(14):2749–2756.
- ¹¹⁰Bajtarevic A, Ager C, Pienz M, Klieber M, Schwarz K, Ligor M, et al. Noninvasive detection of lung cancer by analysis of exhaled breath. *BMC Cancer* 2009, 9:348.
- ¹¹¹Crohns M, Saarelainen S, Laitinen J, Peltonen K, Alho H, Kellokumpu Lehtinen P. Exhaled pentane as a possible marker for survival and lipid peroxidation during radiotherapy for lung cancer—a pilot study. *Free Radic Res* 2009, 43(10):965–974.
- ¹¹²Peng G, Tisch U, Adams O, Hakim M, Shehada N, Broza YY et al. Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nat Nanotechnol* 2009, 4(10):669–673.
- ¹¹³Poli D, Goldoni M, Caglieri A, Ceresa G, Acampa O, Carbognani P, Rusca M, Corradi M: Breath analysis in non small cell lung cancer patients after surgical tumour resection. *Acta Biomed* 2008, 79(Suppl 1):64–72.
- ¹¹⁴Miekisch W, Kischkel S, Sawacki A, Liebau T, Mieth M, Schubert JK. Impact of sampling procedures on the results of breath analysis. *J Breath Res.* 2008; 2:1-7.
- ¹¹⁵Jareño-Esteban JJ, Muñoz-Lucas MA, Carrillo-Aranda B, Maldonado-Sanz JA, de Granda-Orive I, Aguilar-Ros A, et al. Estudio de compuestos orgánicos volátiles en aire exhalado en una población clínicamente sana: efecto del tabaquismo. *ArchBronconeumol.* 2013;49:457-61.
- ¹¹⁶Huang J, Kumar S and Hanna GB. Investigation of C3–C10 aldehydes in the exhaled breath of healthy subjects using selected ion flow tube-mass spectrometry (SIFT-MS). *J. Breath Res.*2014. [doi:10.1088/1752-7155/8/3/037104](https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/3/037104)
- ¹¹⁷Jie Li, Yulan Peng, Yong Liu, Wenwen Li, Ya Jin, Zhentao Tang, et al. Investigation of potential breath biomarkers for the early diagnosis of breast cancer using gas chromatography–mass spectrometry. *Clin.Chim Acta.* 2014;436:59-67.
- ¹¹⁸Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, Alinovi R, Mutti A. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167:1380-6.
- ¹¹⁹Van Berkel JJ, Dallinga JW, Möller GM, Godschalk RW, Moonen EJ, Wouters EF, et al. A profile of volatile organic compounds in breath discriminates COPD patients from controls. *Respir Med.* 2010;104(4):557-63.
- ¹²⁰Fens N, de Nijs SB, Peters S, Dekker T, Knobel HH, Vink TJ, et al: Exhaled air molecular profiling in relation to inflammatory subtype and activity in COPD. *EurRespir J* 2011, 38(6):1301–1309
-

-
- ¹²¹Basanta M, Ibrahim B, Dockry r, Douce D, Morris M, Singh D, et al. Exhaled volatile organic compounds for phenotyping chronic obstructive pulmonary disease: a cross-sectional study. *Respiratory Research*. 2012;13:72-80.
- ¹²²Phillips C, Mac Parthaláin N, Syed Y, Deganello D, Claypole T and Lewis K. Short-term intra-subject variation in exhaled volatile organic compounds (VOCs) in COPD patients and healthy controls and its effect on disease classification. *METABOLITES*. 2014;4(2):300-18.
- ¹²³Besa V, Teschler H, Kurth I, Maqbul Khan A, Zarogoulidis P, Baumbach JI, et al. Exhaled volatile organic compounds discriminate patients with chronic obstructive pulmonary disease from healthy subjects. *Int J COPD*. 2015;10: 399–406.
- ¹²⁴Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest*. 1997;111(6):1710-7.
- ¹²⁵ICH Q2. Validation of Analytical Procedures. 2005.
- ¹²⁶Kwak J, Fan M, Harshman S, Garrison C, Dershem V, Phillips J, et al. Evaluation of Bio-VOC Sampler for Analysis of Volatile Organic Compounds in Exhaled Breath. *Metabolites*. 2014;4(4):879-88.
- ¹²⁷Robroeks CM, van Berkel JJ, Dallinga JW, Jöbsis Q, Zimmermann LJ, Hendriks HJ, et al. Metabolomics of volatile organic compounds in cystic fibrosis patients and controls. *Pediatr Res*. 2010; 68(1):75-80.
- ¹²⁸Sponnring A, Filipiak W, Mikoviny T, Ager C, Schubert J, Miekisch W, et al. Release of volatile organic compound from the lung cancer cell line NCI-H2087 in vitro. *Anticancer Res*. 2009; 29(1):419-26.
- ¹²⁹Wehinger A, Schmid A, Mechtcheriakov S, Maximilian Ledochowski, Christoph Grabmeyer, Guenther A. Gastl, Anton Amann. Lung cancer detection by proton transfer reaction mass-spectrometric analysis of human breath gas. *Int J Mass Spectrom* 2007; 265: 49–59.
- ¹³⁰Mazzone PJ, Hammel J, Dweik R, Na J, Czich C, Laskowski D, et al. Diagnosis of lung cancer by the analysis of exhaled breath with a colorimetric sensor array. *Thorax*. 2007; 62: 565–8.
- ¹³¹Gendron KB, Hockstein NG, Thaler ER, Vachani A, Hanson CW. In vitro discrimination of tumor cell lines with an electronic nose. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2007; 137: 269–73.
- ¹³²Miekisch W, Schubert JK. From highly sophisticated analytical techniques to life-saving diagnostics: technical developments in breath analysis. *TrAC*. 2006; 7:665–73.

-
- ¹³³ Svensson S, Larstad M, Broo K, Olin AC. Determination of aldehydes in human breath by on-fibre derivatization solid phase microextraction and GC-MS. *J Chromatogr B: Anal Technol Biomed Life Sci.* 2007;860:86–91.
- ¹³⁴ J Jareño, MA Munoz, B Carrillo, JA Maldonado, C Civera, A Aguilar, G Rodriguez, C Gutiérrez, JL Alvarez Sala, L Callol. Volatile Organic Compounds (VOC) in exhaled breath in patients with lung cancer, using the analytical technique Thermal desorber- gase chromatography – mass spectrometer. *Eur. Resp. J* 2012; 40 (suppl 56): 681S
- ¹³⁵ J JareñoJ, M.A. Muñoz, J.A. Maldonado, B. Carrillo, G. Rodríguez Trigo, C. Civera, A. Aguilar, M. Caamaño, C. Gutiérrez, L. Callol. Volatile Organic Compounds (VOC) in exhaled breath in patients with lung cancer (LC). *Lung cancer.* 2012;77(Suppl1): S31-S32.
- ¹³⁶ Wagner C, Muñoz MA, Jareño J, Gutiérrez C, Aguilar A, Carrillo B, Maldonado JA, Civera C, Callol L. Volatile organic compounds (VOC): new biomarkers in exhaled breath samples of lung cancer patients with and without chronic obstructive pulmonary disease. *Chest.* 2014; 145:332A.
- ¹³⁷ Phillips CO, Syed Y, Parthaláin NM, Zwiggelaar R, Claypole TC, Lewis KE. Machine learning methods on exhaled volatile organic compounds for distinguishing COPD patients from healthy controls. *J Breath Res.* 2012;6:036003. <http://dx.doi.org/10.1088/1752-7155/6/3/036003>.
- ¹³⁸ .Phillips M, Herrera J, Krishnan S, Zain M, Greenberg J, Cataneo RN. Variation in volatile organic compounds in the breath of normal humans. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1999; 729:75-88.
- ¹³⁹ De Torres JP., Marín JM, Casanova C, Cote C, Carrizo S, Cordoba-Lanus E, et al. Lung Cancer in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(8):913-9.
- ¹⁴⁰ Raviv S, Hawkins KA, De Camp M, Kalhan R. Lung Cancer in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183(9):1138-46.

